

Bedeutung der Baumart für die Aktivität, Diversität und Abundanz methanoxidierender Bakterien in temperaten Waldböden

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Naturwissenschaften

Dr. rer. nat.

der Fakultät für Biologie, Chemie und Geowissenschaften

der Universität Bayreuth

vorgelegt von

Daniela Marina Degelmann

Bayreuth, April 2010

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Biologie, Chemie und Geowissenschaften der Universität Bayreuth genehmigten Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades Doktor der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.).

Die vorliegende Arbeit wurde von Dezember 2006 bis April 2010 an den Lehrstühlen Ökologische Mikrobiologie unter der Leitung von Prof. Harold L. Drake und Bodenökologie unter der Leitung von Prof. Egbert Matzner an der Universität Bayreuth angefertigt.

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Stephan Clemens
Tag des wissenschaftlichen Kolloquiums: 13. Oktober 2010

Prüfungsausschuss:

Prof. Harold L. Drake	(Erstgutachter)
Prof. Dr. Egbert Matzner	(Zweitgutachter)
Prof. Dr. Ortwin Meyer	(Vorsitzender)
PD Dr. Werner Borken	
Prof. Dr. Gerhard Gebauer	

Die Arbeit wurde mit Mitteln der Deutschen Forschungsgemeinschaft (Fördernummer: Ko2912/2-1) und der Universität Bayreuth ermöglicht.

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG.....	1
1.1	Methan als klimarelevantes Spurengas	1
1.2	Methanquellen und –senken.....	1
1.3	Biologische Methanoxidation	2
1.4	Methanotrophe Bakterien.....	3
1.4.1	Taxonomie und Physiologie	3
1.4.2	Atmosphärische Methanoxidierer.....	9
1.5	Umweltfaktoren mit Einfluss auf die atmosphärische Methanoxidation	11
1.5.1	Klimatische Faktoren.....	11
1.5.1.1	Temperatur.....	11
1.5.1.2	Wassergehalt	11
1.5.2	Baumart.....	12
1.5.2.1	Gasdiffusion durch die organische Auflage.....	12
1.5.2.2	pH-Wert	12
1.5.2.3	Ammonium	13
1.5.2.4	Ethylen.....	13
1.5.2.5	Monoterpene	14
1.6	Zielsetzung und Hypothesen	14
2	MATERIAL UND METHODEN	16
2.1	Verwendete Chemikalien und Gase	16
2.2	Standortbeschreibung.....	16
2.3	Probennahme	17
2.4	Probenaufbereitung	18

2.5	Boden-Inkubationen	20
2.5.1	<i>In situ</i> Methanoxidation	20
2.5.2	Methanoxidation intakter Bodenkerne	21
2.5.2.1	Mikrokosmenanlage	21
2.5.2.2	Methodenoptimierung	23
2.5.2.2.1	<i>Aufbau und Technik</i>	23
2.5.2.2.2	<i>Matrixpotenzial</i>	24
2.5.2.3	Atmosphärische Methanoxidation und Michaelis-Menten-Kinetiken	25
2.5.2.4	Einfluss der organischen Auflage	25
2.5.3	Vertikale Verteilung der Methanoxidation und Ethylenproduktion.....	25
2.5.4	Einfluss der Baumwurzeln auf die Methanoxidation	26
2.5.5	Einfluss von β-Pinen auf die Expression der pMMO	26
2.6	Analytische Methoden	27
2.6.1	Bodentextur	27
2.6.2	Trockengewicht und Wassergehalt	28
2.6.3	pH-Wert.....	29
2.6.4	Ammonium.....	29
2.6.5	Gase	30
2.6.6	Trübung von Medien.....	31
2.7	Most probable number technique (MPN)	32
2.8	Molekularbiologische Methoden	34
2.8.1	Nukleinsäure-Präparation	34
2.8.1.1	DNA-Extraktion aus gefrorenen Bodenproben.....	34
2.8.1.2	RNA-Extraktion aus Flüssigproben.....	35
2.8.1.3	<i>In vitro</i> Transkription von mRNA in cDNA	35
2.8.1.4	<i>In vitro</i> Transkription von DNA in RNA	36
2.8.1.5	DNase-Verdau	36
2.8.2	Bestimmung der Quantität und Qualität von Nukleinsäuren.....	37

2.8.2.1	Spektrophotometrische Messung	37
2.8.2.2	Quantifizierung mit Pico-/Ribo-Green	37
2.8.3	Polymerase-Kettenreaktion	37
2.8.3.1	Konventionelle PCR	38
2.8.3.2	Quantitative PCR	41
2.8.3.2.1	Genotypspezifische Assays	42
2.8.3.2.2	Korrekturassay INHIB-CORR	43
2.8.4	Agarose-Gelelektrophorese	45
2.8.5	Aufreinigung von PCR-Produkten	46
2.8.5.1	Gelaufreinigung	46
2.8.5.2	Direkte Aufreinigung von PCR-Produkten	46
2.8.6	Klonierung und Sequenzierung	46
2.8.6.1	Ligation	47
2.8.6.2	Transformation	47
2.8.6.3	Klonscreening	48
2.8.7	Phylogenetische Analysen und Primerdesign	49
2.8.7.1	Berechnung eines distanzbasierten Richtwerts („Cut-Off“) zur	49
	Differenzierung von methanotrophen OTUs auf Artenebene	49
2.8.7.2	Genbibliotheken	51
2.8.8	Diversitätsanalysen	51
2.8.8.1	Rarefaction	51
2.8.8.2	Extrapolation	52
2.8.8.3	Quantitativer Genbibliothek-Vergleich	53
2.8.9	Weitere statistische Verfahren	53
2.8.9.1	Mittelwert, Standardabweichung, Median und Perzentile	53
2.8.9.2	Fehlerfortpflanzung	54
2.8.9.3	Regression	54
2.8.9.4	Signifikanztest	54
3	ERGEBNISSE	55
3.1	Bodencharakteristika	55

3.2	Einfluss der Baumart auf die Methanoxidation	55
3.2.1	<i>In situ</i> Methanoxidation	55
3.2.2	Methanoxidation intakter Bodenkerne	56
3.2.2.1	Atmosphärische Methanoxidation.....	56
3.2.2.2	Michaelis-Menten-Kinetiken.....	56
3.2.3	Vertikale Verteilung der atmosphärischen Methanoxidation	58
3.2.4	Einfluss der Baumwurzeln auf die Methanoxidation	58
3.3	Vergleichende Analyse von Umweltfaktoren.....	61
3.3.1	Organische Auflage	61
3.3.2	pH-Wert.....	62
3.3.3	Ammoniumkonzentration.....	63
3.3.4	Ethylenproduktion	64
3.4	Einfluss von β-Pinen auf die Expression der pMMO	65
3.5	Zusammensetzung der methanotropen Gemeinschaft.....	67
3.5.1	Distanzbasierter Richtwert („Cut-off“) zur Differenzierung methanotropher OTUs auf Artenebene	67
3.5.2	Diversität	69
3.5.2.1	<i>pmoA</i>	69
3.5.2.1.1	Genbibliotheken	69
3.5.2.1.2	Quantitative und qualitative Analyse der Genbibliotheken	69
3.5.2.1.3	Phylogenetische Zuordnung der Gensequenzen.....	72
3.5.2.2	<i>mmoX</i> und <i>pmoA</i> von <i>Verrucomicrobia</i>	76
3.5.3	Abundanz	77
3.5.3.1	MPNs.....	77
3.5.3.2	qPCR	77
3.5.3.2.1	Qualität des qPCR-Assays Q-USC α	78
3.5.3.2.2	Genzahlen.....	79
3.6	Zellspezifische Aktivität von USCα.....	81

4	DISKUSSION	82
4.1	Einfluss der Baumart auf die Methanoxidation	82
4.1.1	Methanoxiderationsraten von Buchen- und Fichtenwaldböden	82
4.1.2	Vertikale Verteilung der Methanoxidation in Waldböden.....	84
4.2	Umweltfaktoren mit Einfluss auf die atmosphärische Methanoxidation	85
4.2.1	Organische Auflage	85
4.2.2	pH-Wert.....	85
4.2.3	Ammonium.....	86
4.2.4	Ethylen.....	87
4.2.5	Monoterpene	88
4.3	Diversität und Abundanz atmosphärischer Methanoxidierer.....	90
4.4	Die ökologische Nische von USCα	92
4.5	Relevanz der verminderten Methanoxidation in Fichtenwaldböden	94
4.6	Modell: Atmosphärische Methanoxidation in Buchen- und Fichtenwaldböden durch unkultivierte Methanotrophe	95
4.7	Ausblick	97
5	ZUSAMMENFASSUNG.....	99
6	SUMMARY	101
7	LITERATURVERZEICHNIS	103
	DANKSAGUNG	126
	PUBLIKATIONEN.....	128
	CURRICULUM VITAE	130
	ERKLÄRUNG	131

ABBILDUNGEN

Abbildung 1: Intrazelluläres Membransystem bei <i>Methylococcaceae</i> , <i>Methylocystaceae</i> und methanotrophen <i>Verrucomicrobia</i>	5
Abbildung 2: Methan-Metabolismus methanotropher Bakterien.	8
Abbildung 3: Übersicht über die Untersuchungsziele dieser Arbeit	15
Abbildung 4: Haubenmethode zur Bestimmung der <i>in situ</i> Methanoxidationsrate	21
Abbildung 5: Schematischer Aufbau (A) und Fotografie (B) der Mikrokosmenanlage.	22
Abbildung 6: Dreieckskoordinatensystem der Feinkörnung eines Bodens.....	28
Abbildung 7: Michaelis-Menten-Kinetiken der Methanoxidation der Buchen- und Fichtenbodenkerne von Steigerwald und Unterlüß.	57
Abbildung 8: Vertikale Verteilung der Methanoxidationsraten in Buchen- und Fichtenwaldböden von Solling, Steigerwald und Unterlüß.	59
Abbildung 9: Methanoxidationsrate in Rhizosphäre und nicht durchwurzelter Boden des Buchen- und Fichtenbestands vom Steigerwald.....	60
Abbildung 10: Ethylenkonzentration nach 72 h Anoxia in verschiedenen Horizonten der Buchen- und Fichtenwaldböden von Solling, Steigerwald und Unterlüß.....	64
Abbildung 11: Einfluss von β -Pinen auf die Oxidation von 100 ppm Methan in Bodenaufschlämmungen des Buchenbestandes vom Steigerwald.....	66
Abbildung 12: Korrelation der Sequenzähnlichkeit von <i>pmoA</i> (DNA) und PmoA (Protein) mit der Sequenzähnlichkeit der 16S rRNA Gene von 22 paarweise verglichenen, methanotrophen Stämmen.	68
Abbildung 13: Rarefaction-Analyse mit 95%-Konfidenzbereich der verschiedenen OTUs der Gensequenzen der Buchen- und Fichtenwaldböden und der Waldstandorte.....	71

Abbildung 14: Maximum-Likelihood-Stammbaum zur Einordnung der in dieser Arbeit detektierten PmoA-Sequenzen in bekannte Gruppen von PmoA- und AmoA-Sequenzen.	73
Abbildung 15: Dendrogramm der OTUs auf Artenebene innerhalb der Cluster USC α , 5, MHP, AC und des Sequenzclusters um die PmoA von <i>Methylocapsa acidiphila</i>	75
Abbildung 16: PmoA-basierte Zusammensetzung der methanotrophen Lebensgemeinschaft.	76
Abbildung 17: <i>pmoA</i> -, <i>amoA</i> - und 16S rRNA Genzahlen in Buchen- und Fichtenwaldböden von Solling, Steigerwald und Unterlüß.	80
Abbildung 18: Modell der atmosphärischen Methanoxidation in Buchen- und Fichtenwaldböden.	96

TABELLEN

Tabelle 1: Charakteristika methanotropher Bakterien (10, 160, 207).....	6
Tabelle 2: Charakteristika der untersuchten Waldstandorte	17
Tabelle 3: Phosphat-gepufferte Salinelösung (178).....	20
Tabelle 4: Gaschromatographische Analyse bei manueller Probenapplikation	30
Tabelle 5: NMS-Medium (215)	32
Tabelle 6: M1-Medium (54).....	33
Tabelle 7: RT-Transkriptionsansatz.....	35
Tabelle 8: T7 Transkriptionsansatz	36
Tabelle 9: Sequenz, Schmelztemperatur, Zielgen und Position der verwendeten Primer.....	39
Tabelle 10: Reaktionsansätze zur Amplifikation von <i>pmoA</i> , <i>mmoX</i> , des 16S rRNA Gens und des Vektorinserts von Klonen.....	40
Tabelle 11: Thermoprotokoll zur Amplifikation von <i>pmoA</i> , <i>mmoX</i> , des 16S rRNA Gens und des Vektorinserts von Klonen.....	41
Tabelle 12: Reaktionsansätze der qPCR Assays Q-USC α , Q-AOB, BACTERIA, Q-C7 und INHIB-CORR.....	44
Tabelle 13: Thermoprotokoll für die qPCR-Assays Q-USC α , Q-AOB, BACTERIA, Q-C7 und INHIB-CORR.....	44
Tabelle 14: Amplikonlänge, Amplifikationseffizienz und Detektionslimit der qPCR Assays Q-USC α , Q-AOB, BACTERIA, Q-C7 und INHIB-CORR.....	45
Tabelle 15: Ligationsansatz	47
Tabelle 16: LB/Amp/IPTG/X-Gal-Platten	48

Tabelle 17: „Accession Numbers“ der bei der Berechnung des distanzbasierten Richtwerts zur Differenzierung von OTUs auf Artenebene verwendeten <i>pmoA</i> - und 16S rRNA Gensequenzen methanotropher Isolate	50
Tabelle 18: Parameter der Michaelis-Menten-Kinetiken der Methanoxidation der Buchen- und Fichtenwaldbodenkerne von Steigerwald und Unterlüß.	58
Tabelle 19: Effekt der Entfernung der organischen Auflage auf die atmosphärische Methanoxidation in Buchen- und Fichtenwaldböden von Steigerwald und Unterlüß....	61
Tabelle 20: pH-Wert verschiedener Horizonte der Buchen- und Fichtenwaldböden von Solling, Steigerwald und Unterlüß, gemessen in wässrigen und salzhaltigen Extrakten.....	62
Tabelle 21: Ammoniumkonzentration verschiedener Horizonte der Buchen- und Fichtenwaldböden von Solling, Steigerwald und Unterlüß	63
Tabelle 22: <i>pmoA</i> -Genbibliotheken	69
Tabelle 23: Analyse der <i>pmoA</i> -Genfragmente der Methanotrophengemeinschaft verschiedener Waldstandorte	70
Tabelle 24: Vergleich der qPCR-Assays Q-USCα und FOREST hinsichtlich Erfassung von USCα- <i>pmoA</i> -Sequenzen und tatsächlich detektierter <i>pmoA</i> -Genzahlen.....	78
Tabelle 25: Zellspezifische atmosphärische Methanoxidationsraten von USCα in Buchen- und Fichtenwaldböden von Solling, Steigerwald und Unterlüß.	81

GLEICHUNGEN

Gleichung 1: Methanoxidationsrate intakter Bodenkerne.....	23
Gleichung 2: Gravimetrischer Wassergehalt	28
Gleichung 3: Volumetrischer Wassergehalt.....	29
Gleichung 4: Stoffmenge eines Gases in der Gasphase	31
Gleichung 5: Physikalisch gelöste Stoffmenge eines Gases	31
Gleichung 6: Korrigierter Logarithmus der Ausgangskonzentration des Zielgens.....	43
Gleichung 7: Nukleotid- bzw. Aminosäureähnlichkeit S zwischen zwei Sequenzen	49
Gleichung 8: Schätzparameter Chao1	52
Gleichung 9: Shannon-Weaver-Diversitätsindex	52
Gleichung 10: Diversitätsindex Evenness.....	52
Gleichung 11: „Coverage“ einer Genbibliothek.....	52
Gleichung 12: Mittelwert.....	53
Gleichung 13: Standardabweichung	53
Gleichung 14: Median	53
Gleichung 15: Fehlerfortpflanzung bei Summen und Differenzen	54

ABKÜRZUNGEN

A_{230} , A_{260} , A_{280}	Absorption bei 230, 260 bzw. 280 nm
AC	aquatischer Cluster
AMO	Ammonium-Monooxygenase
<i>amoA</i>	Gen der Ammonium-Monooxygenase
Amp	Ampicillin
AOA	ammoniumoxidierende Archaeen
AOB	ammoniumoxidierende Bakterien
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
C6	Cluster 6
C7	Cluster 7
cDNA	copy desoxyribonucleic acid (englisch), komplementäre Desoxyribonukleinsäure
ddH ₂ O	doppelt entsalztes Wasser
DEPC-H ₂ O	mit Diethylpyrocarbonat behandeltes Wasser
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNAse	DNA-Nuklease
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
dsDNA	doppelsträngige Desoxyribonukleinsäure
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> (lateinisch), und andere
f	vorwärts
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations (englisch), Ernährungs- und Landwirtschaftsorganisation der Vereinigten Nationen
FIA	Fließinjektionsanalyse
FID	Flammenionisations-Detektor
(Zahl) x g	Vielfaches der Erdbeschleunigung; $g = 9,81 \text{ m s}^{-2}$
GC	Gaschromatograph/Gaschromatographie
H ₄ F	Tetrahydrofolat
H ₄ MPT	Tetrahydromethanopterin
INHIB-CORR	Assay zur Bestimmung eines Inhibitions-Korrekturfaktors

IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
IZM	intrazelluläres Membransystem
K_M	Michaelis-Menten-Konstante; Substratkonzentration, bei der die Halbsättigung eines Enzyms vorliegt
<i>lacZ</i>	Gen für die β -Galaktosidase
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium (Standardmedium zur Anzucht von <i>Escherichia coli</i>)
M1-Medium	Mineralsalzmedium zur Kultivierung methanotropher Bakterien
MCS	multiple Klonierungsstelle
MHP	Moor House peat cluster
MJN	mittlerer jährlicher Niederschlag
MJT	mittlere jährliche Temperatur
MMO	Methan-Monooxygenase
<i>mmoX</i>	Gen der löslichen Methan-Monooxygenase
MPN	most probable number (englisch), wahrscheinlichste Keimzahl
mRNA	messenger ribonucleic acid (englisch), Boten-Ribonukleinsäure
NAD(P) ⁺	Nikotinamadenindinukleotid(phosphat), oxidierte Form
NAD(P)H	Nikotinamadenindinukleotid(phosphat), reduzierte Form
NMS-Medium	Nitrat-Mineralsalz-Medium zur Kultivierung methanotropher Bakterien
O _a	Humusschicht eines Bodens
O _e	Fermentierungsschicht eines Bodens
O _i	Streuschicht eines Bodens
OTU	operational taxonomic unit (englisch), taxonomische Arbeitseinheit
PCR	polymerase chain reaction (englisch), Polymerase-Kettenreaktion
PCR-H ₂ O	sterilfiltriertes und autoklaviertes doppelt entsalztes Wasser
PE	Polyethylen
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
PLFA	phospho lipid fatty acid (englisch), Phospholipidfettsäuren
pMMO	partikuläre Methan-Monooxygenase
<i>pmoA</i>	Gen der partikulären Methan-Monooxygenase
ppb	parts per billion (englisch), Teile pro Milliarde Teile
ppm	parts per million (englisch), Teile pro Million Teile
Q-AOB	Assay zur Quantifizierung ammoniumoxidierender Bakterien
Q-C7	Assay zur Quantifizierung von Cluster 7
qPCR	quantitative Polymerase-Kettenreaktion

Q-USC α	Assay zur Quantifizierung von upland soil cluster α
r	rückwärts
R ²	Bestimmtheitsmaß
RNA	ribonucleic acid (englisch), Ribonukleinsäure
rRNA	ribosomal ribonucleic acid (englisch), ribosomale Ribonukleinsäure
RT	Reverse Transkriptase
RuMP	Ribulosemonophosphat
sccm	Standard-Kubikzentimeter pro Minute
SIP	stable isotope probing (englisch), Beprobung mit stabilen Isotopen
slm	Standard-Liter pro Minute
sMMO	soluble methane monooxygenase (englisch), lösliche Methan-Monooxygenase
SOC	super optimal broth (englisch), komplexes Nährmedium zur Transformation kompetenter Bakterien
TG	Trockengewicht
T _m	Schmelztemperatur
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
ü NN	über Normal-Null
U	units (englisch), Aktivitätseinheit bei Enzymen
USC α	upland soil cluster alpha
USC γ	upland soil cluster gamma
V _{max}	maximale Umsatzgeschwindigkeit eines Enzyms
w/v	weight per volume (englisch); Gewicht pro Volumen
w/w	weight per weight (englisch); Gewichtsanteile
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-Galaktopyranosid

1 EINLEITUNG

1.1 Methan als klimarelevantes Spurengas

Methan (CH_4) zählt neben Kohlenstoffdioxid, Distickstoffmonoxid und Fluorchlorkohlenwasserstoffen zu den wichtigsten Spurengasen, die für den anthropogenen Treibhauseffekt verantwortlich gemacht werden („Treibhausgase“) (72). Ein Teil der von der Sonne emittierten, kurzwelligen Strahlung wird von der Erdoberfläche absorbiert, wodurch sich diese erwärmt. Der andere Teil wird in langwellige Infrarotstrahlung umgewandelt und wieder emittiert. Die in der Atmosphäre vorhandenen Treibhausgase absorbieren diese langwellige Strahlung und reflektieren einen Teil davon zurück zur Erdoberfläche („natürlicher Treibhauseffekt“) (131). Der durch menschliche Tätigkeiten herbeigeführte Konzentrationsanstieg der atmosphärischen Treibhausgase verstärkt diesen Effekt und führt zur langsamen Erderwärmung („anthropogener Treibhauseffekt“) (72). In den letzten 100 Jahren ist die Durchschnittstemperatur der Erdoberfläche um $0,74^\circ\text{C}$ angestiegen (205).

Der Beitrag von Methan zum anthropogenen Treibhauseffekt wird auf 30% geschätzt (41, 72). Methan ist ein sehr wirksames Treibhausgas, dessen relatives Treibhauspotenzial, auf die letzten 20 Jahre berechnet, dem 72-fachen Treibhauspotenzial von Kohlenstoffdioxid entspricht (72). Die atmosphärische Konzentration von Methan stieg im Zuge der Industriellen Revolution von 715 ppb auf 1732 ppb in den frühen 1990er Jahren (72). Messungen an Eisbohrkernen zeigten, dass sich die Methankonzentration in den vorausgegangenen 650.000 Jahren stets im Bereich von 320 bis 790 ppb bewegte (56, 162). Der starke Anstieg der Methankonzentration ist somit auf anthropogene Effekte zurückzuführen. Seit 1990 verlangsamte sich der Anstieg und um 2005 pendelte sich die Methankonzentration auf einen Wert von $1.774 \pm 1,8$ ppb ein (72).

1.2 Methanquellen und –senken

Die Bildung von Methan erfolgt überwiegend durch anthropogene Einflüsse. Hierbei sind vor allem die Haltung von Wiederkäuern wie Schafen oder Rindern und der Reisanbau zu nennen, wo Methan bei der Umsetzung von Kohlenstoffdioxid und Wasserstoff bzw. von Acetat oder Formiat durch methanogene Archaeen entsteht (39). Weitere wichtige Methanquellen sind Mülldeponien sowie die Verbrennung von Biomasse und fossilen Energieträgern (56). Natürlich gebildetes Methan wird hauptsächlich von Feuchtgebieten, wie Sümpfen oder Mooren, von Ozeanen oder von

Termiten emittiert (56). Auch Methan-Hydrate, Vulkanismus und die Freisetzung von Methan aus Rissen der Erdkruste spielen eine Rolle für den Methan-Eintrag in die Atmosphäre (68). Neuste Erkenntnisse zeigen, dass auch Pflanzen Methan produzieren und somit zum Methan-Eintrag beitragen (112). Insgesamt werden derzeit pro Jahr 582 Tg Methan emittiert (56).

Die Senkenstärke für atmosphärisches Methan liegt derzeit bei 581 Tg pro Jahr. Die größte Senke für Methan ist die Troposphäre (88%) (56). Dort reagiert Methan mit Hydroxylradikalen und wird in mehreren Reaktionsschritten zu Formaldehyd und schließlich zu Kohlenstoffdioxid umgewandelt. Ein kleiner Teil des Methans geht in die Stratosphäre verloren (37, 56). Die belüfteten Böden terrestrischer Ökosysteme stellen mit 5% des globalen atmosphärischen Methan-Abbaus eine signifikante biologische Senke für Methan dar (56). Waldböden werden hierbei als effektivste terrestrische Senke angesehen (46, 190). *In situ* Methanaufnahmeraten in Waldböden betragen bis zu $288 \mu\text{g CH}_4 \text{ m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ (60, 76, 190).

1.3 Biologische Methanoxidation

Methan wird biologisch von unterschiedlichen Prokaryoten oxidiert. Man unterscheidet hierbei zwischen aerober Methanoxidation durch methanotrophe oder ammoniumoxidierende Bakterien und anaerober Methanoxidation durch Archaeen oder denitrifizierende Bakterien.

Methanotrophe sind obligat aerobe, gram-negative Bakterien, die bis auf einige wenige Ausnahmen auf Methan oder Methanol als alleinige Kohlenstoff- und Energiequelle angewiesen sind (85). Schlüsselenzym der methanotrophen Methanoxidation ist die Methan-Monooxygenase (MMO) (85). Aerobe Methanoxidation durch Methanotrophe tritt in nahezu allen terrestrischen und aquatischen Habitaten auf. Methanotrophe in belüfteten Böden („upland soils“), wie beispielsweise Wald- und Wiesenböden, oxidieren atmosphärisches Methan (88, 119, 151). In der Rhizosphäre von Reisfeldern sowie in der oxischen/anoxischen Grenzschicht aquatischer Habitate verringern Methanotrophe die Netto-Emission von Methan durch sofortigen Abbau des durch Methanogenese gebildeten Methans um bis zu 50% (40, 73, 97).

Bakterien der Gattungen *Nitrosospira*, *Nitrosomonas* (β -*Proteobacteria*) und *Nitrosococcus* (γ -*Proteobacteria*) sind ebenfalls in der Lage, Methan zu oxidieren (126). Bevorzugt oxidieren diese Bakterien Ammonium (NH_4^+) und nutzen die daraus gewonnene Energie zur Fixierung von Kohlenstoffdioxid mittels des Calvin-Zyklus (126). Da Methan Ammonium in seiner chemischen Struktur sehr ähnelt, ist es ein Substratanalogon für das Schlüsselenzym der Ammoniumoxidation,

die Ammonium-Monooxygenase (AMO). Die Oxidation von Methan ist eine unspezifische Nebenreaktion dieses Enzyms. Wachstum dieser Gattungen mit Methan als alleiniger Kohlenstoffquelle wurde nicht beobachtet (109, 212). Die Affinität der AMO zu Methan entspricht weniger als einem Fünftel der Affinität zu Ammonium (12), weshalb davon ausgegangen wird, dass die aerobe Oxidation von Methan durch ammoniumoxidierende Bakterien (AOB) nur einen geringen Beitrag zum Methanfluss leistet (21). Auch *Crenarchaeota* (*Nitrosopumilus*, *Nitrosocaldus*) können Ammonium oxidieren (125, 204). Da sich die archaeale AMO jedoch stark von der bakteriellen AMO und der MMO unterscheidet (155), ist bislang unklar, ob ammoniumoxidierende Archaeen (AOA) in der Lage sind, Methan zu oxidieren.

In der Tiefsee (Sedimente, Hydrothermalquellen), aber auch in der anoxischen Wassersäule großer Seen wird Methan unter Verwendung von Sulfat, Nitrit, Mangan oder Eisen als Elektronenakzeptoren oxidiert (121, 208). Die sulfatabhängige anaerobe Methanoxidation erfolgt in syntrophen Konsortien aus bisher unkultivierten Archaeen der Taxa ANME-1, -2 und -3 und sulfatreduzierenden Bakterien (23, 121, 158). Die bei der mangan- und eisenabhängigen anaeroben Methanoxidation beteiligten Mikroorganismen sind noch nicht eindeutig identifiziert (11). Denitrifizierende Bakterien vom Phylum NC10 koppeln vermutlich die anaerobe Oxidation von Methan an die Reduktion von Nitrit (69, 70, 168). Die Netto-Emission von Methan aus Ozeanen und großen Seen wird durch die anaerobe Oxidation von Methan bedeutend verringert.

Der Fokus dieser Arbeit liegt auf der aeroben Methanoxidation durch methanotrophe Bakterien in Waldböden.

1.4 Methanotrophe Bakterien

1.4.1 Taxonomie und Physiologie

Die ersten methanotrophen Bakterien wurden bereits vor über 100 Jahren isoliert (111, 192). Inzwischen wurden 17 methanotrophe Genera isoliert bzw. angereichert und charakterisiert (Tabelle 1). Innerhalb der α -*Proteobacteria* finden sich methanotrophe Gattungen in den Familien *Methylocystaceae* und *Beijerinckiaceae*. Methanotrophe der Familie *Methylococcaceae* gehören zu den γ -*Proteobacteria* (85, 207). Die meisten methanotrophen Isolate sind mesophil und neutrophil. Auch einige thermophile, psychrophile und alkaliphile Stämme wurden bisher beschrieben (22, 113, 159). *Methylocella* und *Methylocapsa* sind als einzige Gattungen innerhalb der methanotrophen *Proteobacteria* moderat acidophil mit pH-Optima zwischen 5,0 und 5,5 (53). Im

Jahr 2007 gelang jedoch die erfolgreiche Isolierung extrem acidophiler methanotropher Stämme der Gattung *Methylacidiphilum* innerhalb der *Verrucomicrobia*, die auch unterhalb von pH 1 wachsen können (66, 102, 160, 164).

Früher war es üblich, Methanotrophe entsprechend ihrer Merkmale als Typ I oder Typ II zu klassifizieren (85, 215). Entscheidende Merkmale waren die Anordnung des intrazellulären Membransystems, charakteristische Phospholipidfettsäuren (PLFAs), die Form der MMO und der Stoffwechsel, der zur Fixierung von Formaldehyd genutzt wird. Später wurde das bestehende System für Methanotrophe um Typ X erweitert (*Methylococcus*, *Methylocaldum*, Tabelle 1) (207). Für die Genera *Methylocapsa*, *Methylocella* und *Methylacidiphilum* findet jedoch auch das erweiterte System der Klassifizierung keine Anwendung mehr und wird deshalb im Verlauf dieser Arbeit nicht verwendet.

Physiologisch auffällig ist das ausgeprägte, intrazelluläre Membransystem (IZM) bei Methanotrophen (Abbildung 1). Dieses liegt meist in Form von Stapeln im Cytoplasma der Zellen vor (*Methylococcaceae*) oder ist als ringförmige Stapel parallel zur Zellmembran angeordnet (*Methylocystaceae*) (85). *Methylocella*, *Methylocapsa* und *Methylacidiphilum* zeigen ein abweichendes Membransystem. *Methylocella* besitzt kein oder nur ein schwach ausgebildetes, vesikuläres IZM, das mit der Cytoplasmamembran verbunden ist (49, 52, 63). Bei *Methylocapsa* ist das IZM dagegen gut ausgebildet als parallele Stapel auf nur einer Seite der Zellmembran (50). *Methylacidiphilum* weist statt eines typischen IZMs vielgestaltige, sackartige Organellen im Zellinneren auf (66, 102, 164).

Die Analyse der Phospholipidfettsäuren (PLFAs, Bestandteile der Zellmembran) erlaubte zunächst eine eindeutige Unterscheidung von *Methylococcaceae* und *Methylocystaceae*. Diese Technik wird zur Charakterisierung methanotropher Gemeinschaften in verschiedenen Habitaten herangezogen und in Kombination mit SIP (Beprobung mit stabilen Isotopen) oder der Analyse von mRNA kann der aktive Teil der methanotrophen Population identifiziert werden (36, 43, 186). Typische PLFAs bei *Methylococcaceae* sind 14:0 oder 16:1 Fettsäuren. *Methylocystaceae* weisen vorwiegend Fettsäuren vom Typ 18:1 auf (85). Durch die zunehmende Zahl an methanotrophen Isolaten ist diese Unterscheidung jedoch nicht mehr eindeutig und deshalb in Tabelle 1 nicht aufgeführt. *Methylocystis heyeri* beispielsweise verfügt über fast identische Mengen von 18:1 und 16:1 Fettsäuren (48).

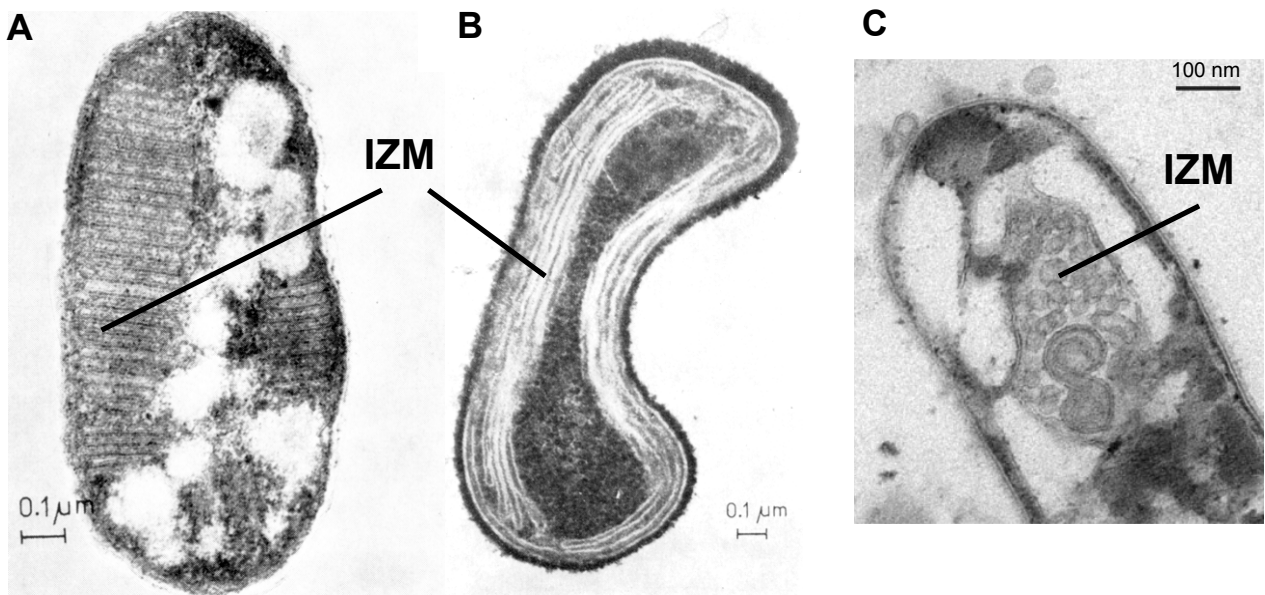


Abbildung 1: Intrazelluläres Membransystem bei *Methylococcaceae*, *Methylocystaceae* und methanotrophen *Verrucomicrobia*. (A) *Methylobacterium methanica*, IZM in Stapeln im Cytoplasma organisiert; (B) *Methylobacterium methanolicum*, IZM als ringförmige Stapel parallel zur Zellmembran angeordnet; (C) *Methylobacterium acidiphilum inferorum*, IZM als sackartige Organellen im Zellinneren ausgebildet; (66, 91)

Methanotrophe sind, bis auf einige wenige Ausnahmen, auf Methan oder Methanol als alleinige Kohlenstoff- und Energiequelle angewiesen (85). Spezies der Gattung *Methylobacterium* (*M. palustris*, *M. silvestris* und *M. tundrae*) (49, 52, 63) sind jedoch fakultativ methanotroph. Sie ziehen die komplexeren Kohlenstoffverbindungen Acetat, Pyruvat, Succinat, Malat und Ethanol Methan vor (51). Auch *Methylobacterium aurea* kann Formiat und Acetat als Kohlenstoffquelle nutzen (62). *Crenothrix polyspora* oxidiert Acetat und Glukose, wenn kein Methan verfügbar ist (195). Die übrigen methanotrophen Isolate sind obligat methanotroph (85). Das Schlüsselenzym der aeroben Methanoxidation, die MMO, kommt ausschließlich in methanotrophen Bakterien vor (85). Sie katalysiert den ersten Schritt der Oxidation von Methan zu Methanol (Abbildung 2). Dieser Schritt ist sauerstoffabhängig. Die MMO liegt in zwei unterschiedlichen Formen vor: als lösliche, cytoplasmatische (sMMO) und als partikuläre, membrangebundene (pMMO) Form (85).

Tabelle 1: Charakteristika methanotropher Bakterien (10, 160, 207)

PHYLUM, Familie, Gattung	MMO-Form	IZM^a	Kohlenstoff-Assimilationsweg^b	Typ
<i>α-PROTEOBACTERIA</i>				
<i>Beijerinckiaceae</i>				
<i>Methylocapsa</i>	pMMO	A	Serin	n.a. ^c
<i>Methylocella</i>	sMMO	A	Serin	n.a. ^c
<i>Methylocystaceae</i>				
<i>Methylocystis</i>	pMMO/sMMO	P	Serin	II
<i>Methylosinus</i>	pMMO/sMMO	P	Serin	II
<i>γ-PROTEOBACTERIA</i>				
<i>Methylococcaceae</i>				
<i>Clonothrix^d</i>	pMMO	S	RuMP	I
<i>Crenothrix^d</i>	pMMO	S	RuMP	I
<i>Methylobacter</i>	pMMO	S	RuMP	I
<i>Methylocaldum^e</i>	pMMO	S	RuMP/Serin/Calvin	X
<i>Methylococcus^e</i>	pMMO/sMMO	S	RuMP/Serin/Calvin	X
<i>Methylohalobius</i>	pMMO	S	RuMP	I
<i>Methylomicrobium^f</i>	pMMO	S	RuMP	I
<i>Methylomonas^e</i>	pMMO	S	RuMP/Serin	I
<i>Methylosarcina</i>	pMMO	S	RuMP	I
<i>Methylosoma</i>	pMMO	S	RuMP	I
<i>Methylosphaera</i>	pMMO	S	RuMP	I
<i>Methylothermus</i>	pMMO	S	RuMP	I
<i>VERRUCOMICROBIA</i>				
<i>Methylacidiphilaceae</i>				
<i>Methylacidiphilum</i>	pMMO	A	Serin/Calvin	n.a. ^c

^a P, IZM ringförmig parallel zur Zellmembran; S, IZM in Stapeln im Cytoplasma; A, abweichendes IZM

^b RuMP, Ribulosemonophosphat-Weg; Serin, Serin-Zyklus; Calvin, Calvin-Zyklus

^c nicht anwendbar

^d Diese Gattungen liegen bislang nur als Anreicherungen vor (195, 209)

^e Diese Gattungen nutzen hauptsächlich den Ribulosemonophosphat-Weg zur Fixierung von Kohlenstoff. Es werden jedoch auch einige Schlüsselenzyme alternativer Kohlenstoffassimilationswege exprimiert.

^f Einige wenige *Methylomicrobium* Stämme exprimieren auch eine sMMO.

Die sMMO ist ein hexameres Enzym aus drei Untereinheiten. Die Hydroxylase-Untereinheit besitzt ein Di-Eisen-Zentrum. Das sMMO-Gencluster beinhaltet die Gene *mmoXYBZDC* (82, 207). Die sMMO hat eine geringe Substrataffinität ($K_M = 3 \mu\text{M}$) und ein breites Substratspektrum (aliphatische und aromatische Kohlenwasserstoffe sowie deren Halogenderivate) (85, 207). Die pMMO ist ein trimeres Enzym, das sowohl Eisen- als auch Kupferatome im aktiven Zentrum enthält. Es besteht aus drei Strukturgenen auf einem Operon (*pmoCAB*) (207). Methanotrophe *Proteobacteria* besitzen das *pmoCAB*-Gencluster in zweifacher Kopie und eine zusätzliche Kopie von *pmoC* (196). Bei *Methyloacidiphilum* wurden dagegen drei vollständige Kopien des Genclusters entdeckt (66, 102, 160, 164). Einige *Methylocystis*-Stämme, z.B. Stamm SC2, besitzen ein zusätzliches, vollständiges Operon (*pmoCAB2*), das für eine zweite pMMO (pMMO2) kodiert, die auf Aminosäureebene nur bis zu 67% der pMMO1 entspricht (65, 170). Die pMMO hat eine höhere Substrataffinität ($K_M = 1\text{-}2 \mu\text{M}$) und ein geringeres Substratspektrum als die sMMO (Alkane und Alkene bis zu C_5) (85, 207). Bis auf die Gattung *Methylocella* besitzen alle Methanotrophen eine pMMO (52). Bei Methanotrophen, die beide Formen des Enzyms exprimieren (*Methylococcus*, *Methylocystis* und *Methylosinus*), ist die Regulation kupferabhängig (132, 156, 157). Die pMMO wird bei diesen Methanotrophen bei hohen Kupferkonzentrationen ($> 2.5 \mu\text{mol g}_{\text{cell}}^{-1}$) synthetisiert (207). Die Fähigkeit zur Expression der sMMO stellt vermutlich eine ökologische Nische bei kupferlimitierten Bedingungen dar.

Methan wird über Methanol, Formaldehyd und Formiat zu Kohlenstoffdioxid oxidiert (Abbildung 2) (44, 85, 99, 210, 213). Ausgehend von Formaldehyd oder Formiat kann Kohlenstoff fixiert und Biomasse aufgebaut werden. Im Ribulosemonophosphat-Weg (RuMP-Weg) reagiert Formaldehyd mit Ribulose-5-Phosphat zu Hexulose-6-Phosphat. Nach mehreren Reaktionen geht der Kohlenstoff in Form von Acetyl-Coenzym A in den Citratzyklus ein. Der RuMP-Weg wird ausschließlich von *Methylococcaceae* benutzt (85). *Methylocystaceae*, *Beijerinckiaceae*, *Methyloacidiphilaceae* und einige wenige *Methylococcaceae* fixieren Kohlenstoff über den Serin-Zyklus. Wie im RuMP-Weg geht der Kohlenstoff nach mehreren Reaktionsschritten in Form von Acetyl-Coenzym A in den Citratzyklus ein (85).

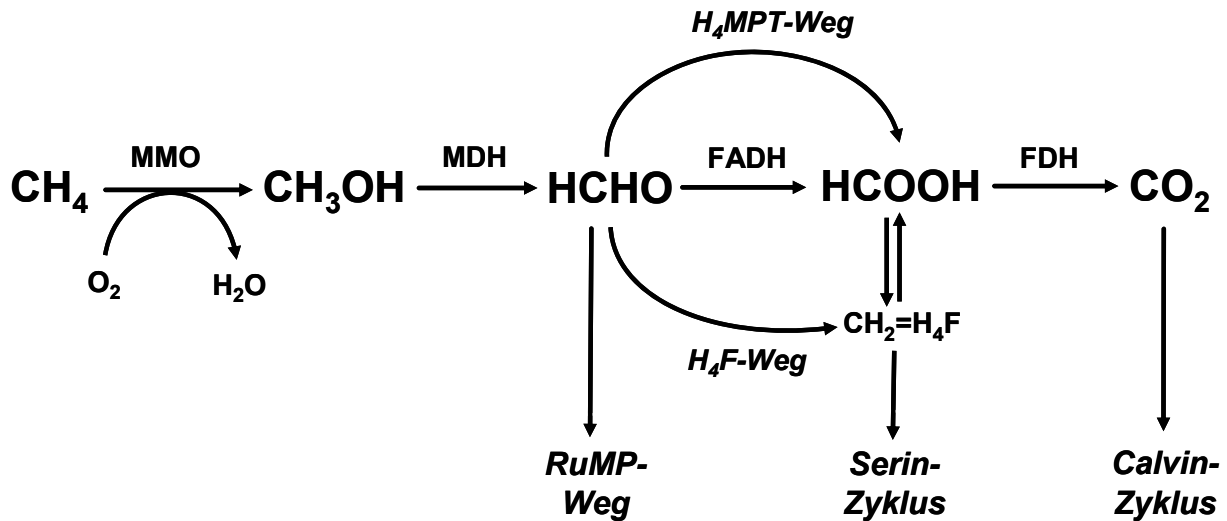


Abbildung 2: Methan-Metabolismus methanotropher Bakterien. MMO, Methan-Monooxygenase; MDH, Methanol-Dehydrogenase; FADH, Formaldehyd-Dehydrogenase; FDH, Formiat-Dehydrogenase; H₄MPT, Tetrahydromethanopterin; H₄F, Tetrahydrofolat; RuMP, Ribulosemonophosphat; CH₄, Methan; CH₃OH, Methanol; HCHO, Formaldehyd; HCOOH, Formiat; CO₂, Kohlenstoffdioxid; O₂, Sauerstoff; H₂O, Wasser; CH₂=H₄F, Methylentetrahydrofolat; (44, 85, 99, 210, 213).

Die Oxidation von Formaldehyd zu Formiat kann über den direkten Weg mittels des Enzyms Formaldehyd-Dehydrogenase, über den tetrahydrofolatabhängigen Weg (H₄F-Weg) oder über den tetrahydromethanopterinabhängigen Weg (H₄MPT-Weg) erfolgen (207). Methanotrophe, die Kohlenstoff über den Serin-Zyklus fixieren, nutzen vorwiegend den H₄F-Weg. Methylentetrahydrofolat dient hierbei als Akzeptor für Formaldehyd. Formiat stellt den Kohlenstoffpool der Zelle dar (44, 210). Die Reaktion zwischen Methylentetrahydrofolat und Formiat ist reversibel. So kann Formaldehyd, je nach Bedürfnis des Bakteriums, oxidiert oder assimiliert werden (210). Auch Methanotrophe, die nicht den Serin-Zyklus zur Kohlenstofffixierung nutzen, besitzen den H₄F-Weg. Seine Funktion in diesen Organismen ist jedoch bislang ungeklärt (210). Der H₄MPT-Weg wurde in allen methanotrophen Bakterien nachgewiesen (211). Er stellt einen effektiven Prozess zur Bildung von NAD(P)H dar (210). Aufgrund des Vorhandenseins des NAD(P)⁺-unabhängigen, direkten Weges über die Formaldehyd-Dehydrogenase ist jedoch die Rolle des H₄MPT-Wegs bislang unklar (207). Einige Methanotrophe, wie z.B. *Methylococcus*, können Kohlenstoffdioxid auch über den Calvin-Zyklus fixieren (201).

Keins der methanotrophen Isolate ist fähig, bei atmosphärischen Methankonzentrationen zu wachsen. Sie sind alle auf deutlich höhere Konzentrationen angewiesen (85). Einige *Methylocystis*

Stämme (DWT, LR1 und SC2) können mit Hilfe ihrer hoch affinen pMMO2 atmosphärisches Methan umsetzen und so eine Zeit lang bei 1,8 ppm Methan überleben, doch Wachstum konnte nicht nachgewiesen werden (64, 117). Bisläng nicht-kultivierte Methanotrophe müssen für die Oxidation atmosphärischen Methans verantwortlich sein.

1.4.2 Atmosphärische Methanoxidierer

Belüftete Böden, aber auch während der Sommermonate ausgetrocknete Moore und Sümpfe, sind Senken für atmosphärisches Methan (86, 151, 194). Den ersten Hinweis auf die Existenz methanotropher Bakterien, die in der Lage sind, atmosphärisches Methan zu oxidieren, brachten Bender und Conrad (13). Sie konnten in Bodenproben, die zuvor drei Wochen bei 20% Methan inkubiert worden waren, in Abhängigkeit der Methankonzentration zweiphasige Michaelis-Menten-Kinetiken nachweisen. Sie unterschieden zwischen einer „hoch-affinen“ Aktivität mit K_M -Werten im nM-Bereich und niedrigen v_{max} -Werten, die bei niedrigen Methankonzentrationen auftrat und auch in frischen Bodenproben beobachtet werden konnte, und einer „niedrig-affinen“ Aktivität mit K_M -Werten im μ M-Bereich und 25 bis 129 Mal höheren V_{max} -Werten, die bei höheren Methankonzentrationen einsetzte und den kinetischen Parametern kultivierter Methanotropher ähnelte. Aufgrund dieser Ergebnisse stellten sie die Hypothese auf, dass in oxischen Böden nicht-kultivierte methanotrophe Bakterien existieren, die an die niedrige atmosphärische Methankonzentration angepasst sind. Ähnlich niedrige K_M -Werte wurden auch in anderen, untersuchten, belüfteten Böden nachgewiesen (14, 45, 110, 172, 176).

Der Einsatz funktioneller Genmarker ermöglicht die Analyse der mikrobiellen Gemeinschaft (auch nicht-kultivierter Organismen) in Umweltproben. Als funktionelle Genmarker für Methanotrophe werden die Gene *pmoA* und *mmoX* verwendet, die jeweils für die Hydroxylase-Einheit der pMMO bzw. der sMMO methanotropher Bakterien kodieren (144). AOB werden mit Hilfe des Gens *amoA* detektiert, das für die Hydroxylaseuntereinheit der AMO kodiert. Die Sequenzen der AMO und MMO sind sehr ähnlich. Es handelt sich um homologe Enzyme mit gleichem evolutionären Ursprung (93).

Mit Hilfe des *pmoA*-Genmarkers wurden in belüfteten Böden, neben bereits bekannten *pmoA*-Sequenzen isolierter Methanotropher, neue Sequenztypen von bisher nicht-kultivierten Methanotrophen nachgewiesen (88, 95, 119). Die am häufigsten in Waldböden detektierten Sequenztypen sind Upland Soil Cluster alpha (USC α ; früher: Forest Soil Cluster, Forest Sequence Cluster oder Forest Clones) (95) und *Methylocystis*-Spezies. Diese Organismen sind in 73% bzw.

44% aller untersuchten Waldböden detektierbar (122). USC α kommt vorwiegend in sauren Böden vor (122). PLFA-SIP-Experimente in Böden, in denen die *pmoA* von USC α dominierte, führten zur Markierung der Fettsäuren 16:0 und 18:1 ω 7c, die für *Beijerinckiaceae*, wie z.B. *Methylocapsa acidiphila*, charakteristisch sind (119). Mit Hilfe einer genomischen Fosmidbibliothek wurde die Verwandtschaft von USC α zu *Methylocapsa acidiphila* bestätigt (171). In einigen Böden mit neutralem pH-Wert wurde der *pmoA*-Sequenztyp Upland Soil Cluster gamma (USC γ) detektiert und die PLFAs 14:0, 16:0 und 16:1 ω 7c markiert. Sowohl das PLFA-Profil als auch die phylogenetische Verwandtschaft der *pmoA*-Sequenzen ließen den Schluss zu, dass USC γ bislang unkultivierte atmosphärische Methanoxidierer innerhalb der *Methylococcaceae* repräsentiert (119). Die Rolle anderer Sequenztypen bleibt bislang ungeklärt. Cluster 5 (88, 120) ist phylogenetisch nahe verwandt zu USC α . Ob Cluster 5 jedoch Methanotrophe repräsentiert, die atmosphärisches Methan oxidieren, bleibt noch zu klären. Cluster 3 (118) fällt in die *Methylococcaceae* und Cluster 4 (89, 118) eher in die *Methylocystaceae* (122). Cluster 1 (123, 161) liegt phylogenetisch zwischen bekannten *pmoA*- und *amoA*-Sequenzen. Inzwischen weiß man, dass es sich bei diesem Sequenztyp um die *pmoA* einiger *Methylocystaceae*-Spezies handelt. Cluster 2 (119) und die Sequenzgruppen um die Umweltklone MR1 (88) und RA21 (95) sind nur entfernt verwandt zu bekannten *pmoA*- und *amoA*-Sequenzen. Somit ist unklar, ob es sich um Genfragmente von pMMO, AMO, unbekannter Enzyme oder sogar um nicht exprimierbare Genfragmente handelt.

Aufgrund der hohen Zahl nicht-kultivierter Methanotropher in Waldböden kommen für deren Quantifizierung nur kultivierungsunabhängige Methoden in Frage. Sonden-Hybridisierungstechniken haben den Nachteil, dass aufgrund der geringen Zahl an Methanotrophen in Böden (0,01 bis 4% der bakteriellen Gemeinschaft) (130, 143) ein großer Arbeitsaufwand nötig ist, um statistisch auswertbare Zahlen zu bekommen (122). Diese Techniken werden deshalb eher in aquatischen Habitaten verwendet (43). PLFA-SIP kann zur absoluten Quantifizierung methanotropher Gruppen herangezogen werden, wenn die Inkubation bei niedriger Methankonzentration erfolgt, die weder Wachstum noch selektive Anreicherung induziert. Diese Methode wurde bislang noch nicht für Waldböden, sondern nur für Wiesen und landwirtschaftlich genutzten Böden angewandt, wo Zellzahlen zwischen $1,2 \times 10^6$ und $7,2 \times 10^6$ Zellen $\text{g}_{\text{TG}}^{-1}$ ermittelt wurden (142, 143). Da fast ausschließlich 16:0 und 18:1 Fettsäuren markiert wurden, kann davon ausgegangen werden, dass die ermittelten Zellzahlen die Abundanz von USC α und/oder anderen *Beijerinckiaceae* reflektieren. Im Vergleich zu PLFA-SIP erlaubt die qPCR durch den Einsatz funktioneller Genmarker eine spezifischere Quantifizierung methanotropher Gruppen. In Waldböden wurden mit dieser Methode methanotrophe Zellzahlen zwischen $0,4 \times 10^6$ und 21×10^6 Zellen $\text{g}_{\text{TG}}^{-1}$ gemessen (118, 123).

1.5 Umweltfaktoren mit Einfluss auf die atmosphärische Methanoxidation

Methanotrophe in belüfteten Böden reagieren sehr empfindlich auf Störungen und sich ändernde Umweltbedingungen. So führt die Umwandlung von Wäldern in landwirtschaftlich genutzte Flächen durch die damit einhergehende Verdichtung der Bodentextur und Einbringung von Düngemitteln zu einer starken Verminderung der atmosphärischen Methanaufnahmeraten (58, 59, 187, 190, 200). Auch die vorherrschende Baumart bei Waldböden oder der Wassergehalt haben einen großen Einfluss auf die atmosphärische Methanoxidation (1.5.2, 1.5.1.2).

1.5.1 Klimatische Faktoren

1.5.1.1 Temperatur

Methanotrophe Reinkulturen haben verschiedene Temperaturoptima. Neben mesophilen wurden auch psychrophile und termophile Arten beschrieben (22, 66, 102, 159, 164). Die Inkubation von Wald- und Wiesenböden bei verschiedenen Temperaturen deutete darauf hin, dass auch Spezies in belüfteten Böden unterschiedliche Temperaturoptima besitzen (98, 149). Gegenteilige Studien zeigen jedoch, dass die Temperatur nur einen geringen Einfluss auf die atmosphärische Methanaufnahme in Waldböden hat (27, 79).

1.5.1.2 Wassergehalt

Der Wassergehalt eines Bodens ist ein bedeutender, regulierender Faktor für die atmosphärische Methanoxidation. Der für die atmosphärische Methanoxidation optimale Wassergehalt in Waldböden liegt zwischen 22 und 25% bzw. bei einem Matrixpotenzial von -200 kPa (141, 184). Bei zu hohem Wassergehalt ist der Gastransport durch verlangsamte Gasdiffusion in den Boden eingeschränkt. Ein geringer Wassergehalt erzeugt dagegen physiologischen Wasserstress (2, 184).

1.5.2 Baumart

Messungen der atmosphärischen Methanaufnahme in Laub- und Nadelwäldern zeigten, dass der Waldtyp (Laub- oder Nadelwald) einen Effekt auf die atmosphärische Methanaufnahme hat. Die atmosphärische Methanaufnahme in Laubwaldbeständen ist generell zwei bis vier Mal höher als in benachbarten Nadelwaldbeständen mit vergleichbarem Klima, Bodentyp und gleicher Nutzungsgeschichte (28, 30, 33). Da die Unterschiede in der atmosphärischen Methanoxidation bei vergleichbarem Matrixpotenzial der Laub- und Nadelwaldböden auftreten, kann davon ausgegangen werden, dass es sich hierbei um einen Effekt der Baumart handelt (28). Als mögliche Ursachen für die verminderte atmosphärische Methanaufnahme in Nadelwäldern im Vergleich zu Laubwäldern werden Unterschiede in der Gasdiffusion durch die organische Auflage in den Boden, im pH-Wert und in der Konzentration inhibitorischer Verbindungen, wie z.B. Ethylen und Monoterpene, diskutiert.

1.5.2.1 Gasdiffusion durch die organische Auflage

Die höchste Aktivität atmosphärischer Methanoxidierer in Waldböden findet sich in den meisten Fällen im oberen Mineralboden (2, 15, 33, 169). Die darüber liegende organische Auflage zeigt dagegen keine methanotrophe Aktivität. Sie bildet eine Diffusionsbarriere für Methan und Sauerstoff. Entfernt man die organische Auflage, bewirkt dies einen Anstieg der atmosphärischen Methanaufnahmerate der Böden (26, 33, 174, 189). Da sich die Struktur der organischen Auflage (Blätter bzw. Nadeln) und die Porosität des Bodens in Laub- und Nadelwäldern stark unterscheiden (9), könnte sich dies auf die Gasdiffusion und somit auf die atmosphärische Methanaufnahme auswirken.

1.5.2.2 pH-Wert

Die Bodenversauerung in den oberen Bodenschichten ist in Nadelwaldböden höher als in benachbarten Laubwaldböden (7). Ursache hierfür ist der höhere Auskämmeffekt der Nadelwaldkronen für säurebildende schwefel- und stickstoffhaltige Luftschadstoffe, aber auch die höhere interne Säureproduktion von Nadelwäldern (173). Es wurde diskutiert, dass der niedrigere pH-Wert in Nadelwäldern zu einer Verminderung der Aktivität und Abundanz Methanotropher und zu einer Verlagerung der Methanotrophen in tiefere Bodenschichten mit geringerer Methanverfügbarkeit führen könnte (28). Ein neutraler pH-Wert kann zudem das Vorkommen von

Regenwürmern und dadurch die Porosität eines Bodens begünstigen und so indirekt die Methanoxidation beeinflussen (90, 153). Bezüglich der pH-Optima scheinen sich atmosphärische Methanoxidierer zu unterscheiden. Während USC α hauptsächlich in sauren Waldböden detektiert wird, findet man USC γ und Cluster 1 in pH-neutralen Waldböden (119, 123). Der pH-Wert könnte sich somit auch auf die Zusammensetzung der methanotrophen Gemeinschaft in Waldböden auswirken.

1.5.2.3 Ammonium

Obwohl die Affinität der MMO zu Methan 600-1300 Mal höher ist als zu Ammonium, kann Letzteres aufgrund seiner ähnlichen chemischen Struktur in einer unspezifischen Nebenreaktion von der MMO oxidiert werden (12). Man spricht hierbei von einer kompetitiven Hemmung des Enzyms (61, 81). Werden belüftete Böden mit Ammonium versetzt, führt dies häufig zur Abnahme der Methanoxidationsrate, vermutlich aufgrund einer Verringerung der Abundanz Methanotropher (105, 143). Hohe Konzentrationen von Ammonium in den oberen organischen Auflagen könnten somit ein Grund für die Verlagerung der methanotrophen Aktivität in den Mineralboden sein (1.5.2.1). Gegenteilige Studien verzeichneten dagegen gar keine oder positive Effekte von Ammonium auf die Methanoxidation (20, 33, 150). Die Wirkung von Ammonium auf Methanotrophe ist demnach noch nicht vollständig geklärt und es ist unklar, ob verschiedene Ammoniumkonzentrationen in Laub- und Nadelwäldern unterschiedliche atmosphärische Methanoxidationsraten bewirken.

1.5.2.4 Ethylen

Ethylen ist ein gasförmiges Phytohormon, das von Pflanzen, aber auch von vielen Bakterien und Pilzen gebildet wird (74). Es beeinflusst Keimwachstum und Seneszenz der Pflanzen und bewirkt unter anderem die Fruchtreifung, Blütenentwicklung und den Abwurf der Blätter. Außerdem dient es als Alarmstoff bei Schädlingsbefall (74). Anaerobiosis fördert die Akkumulation von Ethylen in Böden (185, 217, 220). Da Ethylen von der MMO ebenfalls oxidiert werden kann, inhibierte die Zugabe von 3 bis 10 ppm Ethylen die atmosphärische Methanoxidationsrate in einem Waldboden um 21 bis 98% (104). Es ist denkbar, dass unterschiedliche Ethylenbildungsraten und -konzentrationen in Laub- und Nadelwaldböden Unterschiede in der atmosphärischen Methanaufnahme der Böden bewirken.

1.5.2.5 Monoterpene

Monoterpene sind Verbindungen aus zwei Isopren-Einheiten (allgemeine Strukturformel: $C_{10}H_{16}$). Weltweit sind über 900 Monoterpene in offenkettiger, mono-, bi- oder trizyklischer Form bekannt. Die häufigsten Monoterpene sind α -Pinen, Cineol und Limonen (57). Monoterpene sind Hauptbestandteil der ätherischen Öle und Harze von Koniferen, die sie aufgrund ihrer inhibierenden Wirkung gegen Mikroorganismen zum Schutz vor Schädlingsbefall bilden. Monoterpene wurden vorwiegend in Koniferennadeln und verletzten Wurzeln nachgewiesen (134, 141). Sie inhibieren die Methanoxidation in Waldböden (4, 141) und bei methanotrophen Reinkulturen (*Methylosinus*-Spezies) (3).

1.6 Zielsetzung und Hypothesen

Ziel dieser Arbeit war es, anhand von drei deutschen Waldstandorten mit jeweils benachbarten Fichten- (*Picea abies* L.) und Buchenbeständen (*Fagus sylvatica* L.) die Ursachen für die verminderte atmosphärische Methanaufnahme der Fichtenwaldböden zu identifizieren. Hierzu wurden in beiden Waldtypen die Aktivität, Diversität und Abundanz methanotropher Bakterien sowie verschiedene Umweltfaktoren verglichen, die, neben Monoterpenen (141), für die erniedrigte atmosphärische Methanaufnahme in Fichtenwaldböden verantwortlich sein könnten. Außerdem sollte geklärt werden, ob Monoterpene über Koniferenwurzeln in die Rhizosphäre abgegeben werden und dort die atmosphärische Methanoxidation beeinflussen. Ein weiteres Ziel war die Untersuchung der Wirkung von Monoterpenen auf die Expression der pMMO methanotropher Bakterien. Der Arbeit lagen folgende Hypothesen zugrunde:

Die Methanoxiderationsrate in Fichtenwaldböden ist niedriger als in Buchenwaldböden.

Ursache für diese Aktivitätsunterschiede sind Unterschiede in der Gasdiffusion durch die organische Auflage, im pH-Wert, in der Ammonium- oder in der Ethylenkonzentration der Waldböden.

Monoterpene inhibieren die atmosphärische Methanoxidation in der Rhizosphäre von Fichtenwaldböden und die Expression der pMMO atmosphärischer Methanoxidierer.

Die Diversität und Abundanz atmosphärischer Methanoxidierer in Fichtenwaldböden ist niedriger als in Buchenwaldböden.

Folgende Ziele wurden verfolgt, um die Hypothesen zu untersuchen (Abbildung 3).

1. Vergleich der Methanoxidation in beiden Waldtypen durch Feldmessungen, Messung der Methanoxidation intakter Bodenkernen bei unterschiedlicher Methanverfügbarkeit (Michaelis-Menten-Kinetiken) und der Methanoxidation in unterschiedlichen Bodentiefen.
2. Vergleichende Analyse verschiedener Umweltfaktoren als mögliche Ursache für die verminderte atmosphärische Methanaufnahme von Fichtenwaldböden.
3. Vergleich der Methanoxidation in Rhizosphäre und nicht durchwurzelter Boden sowie Quantifizierung der *pmoA*-Transkripte in einer Bodenaufschlämmung nach Zugabe des Monoterpens β -Pinen.
4. Untersuchung der Diversität, Abundanz und zellspezifischen Aktivität Methanotropher in beiden Waldbodentypen mittels Genbibliotheken und quantitativer Polymerase-Kettenreaktion.

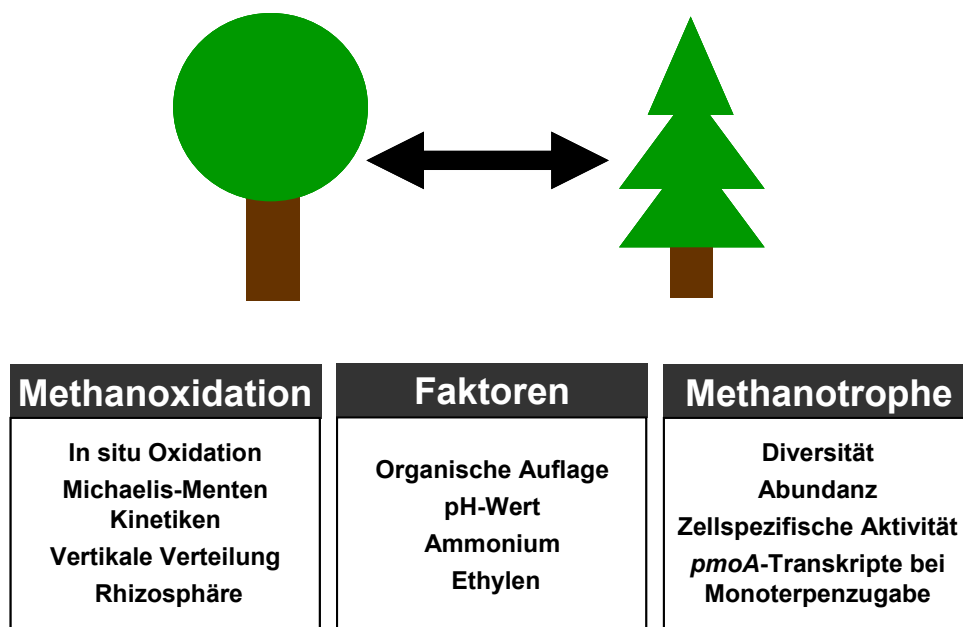


Abbildung 3: Übersicht über die Untersuchungsziele dieser Arbeit

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Verwendete Chemikalien und Gase

Die verwendeten Chemikalien wurden, wenn nicht anders vermerkt, von den Firmen Aldrich (Steinheim, Deutschland), AppliChem (Darmstadt, Deutschland), Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland), Fluka (Buchs, Schweiz), Merck (Darmstadt, Deutschland) und Sigma (Deisenhofen, Deutschland) bezogen. Gase und Gasstandards stammten von der Firma Rießner (Lichtenfels, Deutschland). Oligonukleotide wurden von Biomers.net GmbH (Ulm, Deutschland) bezogen. Puffer, Lösungen und Medien wurden, wenn nicht anders angegeben, mit deionisiertem Wasser (Seralpur Pro 90 CN, Seral Erich Alhäuser, Ransbach-Baumbach, Deutschland) hergestellt, das im Folgenden als ddH₂O bezeichnet wird. Für das Arbeiten mit DNA wurde PCR-H₂O (sterilfiltriertes und autoklaviertes ddH₂O) verwendet, für das Arbeiten mit RNA DEPC-H₂O (mit Diethylpyrocarbonat behandeltes ddH₂O).

2.2 Standortbeschreibung

Für die Untersuchungen wurden Bodenproben von drei deutschen Waldstandorten verwendet: Solling, Steigerwald und Unterlüß. Alle Untersuchungsstandorte haben gemeinsam, dass sich dort jeweils ein Rotbuchenbestand (*Fagus sylvatica* L., European beech) und ein angrenzender Bestand der Gemeinen Fichte (*Picea abies* L., Norway spruce) auf Böden gleichen Ursprungs entwickelt haben. Die Böden aller drei Standorte wurden nach Einteilung der FAO (Food and Agriculture Organization) als „Dystric Cambisols“ (podsolige Braunerden) klassifiziert. Weitere Charakteristika der Waldstandorte sind Tabelle 2 zu entnehmen.

Der Solling ist mit bis zu 528 m ü NN eines der höchsten Mittelgebirge im Norden Deutschlands (198). Er liegt überwiegend in Südniedersachsen, seine äußersten Südausläufer reichen jedoch bis nach Hessen und Nordrhein-Westfalen. Der Solling umfasst 740 km² und ist zu 80 - 90% bewaldet. Die Waldfläche setzt sich zu annähernd gleichen Anteilen aus Laubwald (51%, davon 43% Buche) und Nadelwald (49%, davon 40% Fichte) zusammen (Stand: 1990) (198). Der Standort der Probennahme liegt im Hochsolling nahe Silberborn. Für diesen Standort lagen bereits intensive mehrjährige *in situ* Messungen zur Methanaufnahme vor (24, 28). Der Boden hat einen hohen Schluffanteil aufgrund einer Lössauflage und wird als schluffiger Lehm charakterisiert (28).

Der Steigerwald, zu großen Teilen Naturpark, befindet sich im Norden Bayerns. Er liegt zwischen den vier fränkischen Städten Bamberg, Schweinfurt, Nürnberg und Würzburg und umfasst eine Fläche von etwa 1000 km² (152). Nach dem Spessart ist der Steigerwald das zweitgrößte Laubwaldgebiet Bayerns. Das Waldbild wird dominiert von Buchen- und Buchen-Eichen-Mischwäldern (67).

Unterlüß ist eine Gemeinde im Landkreis Celle in Niedersachsen, die im Lüßwald inmitten des Naturparks Südheide liegt. Der Lüßwald ist ein Mischwald aus Kiefern, Fichten, Buchen, Eichen und Birken und zählt mit seinen 7500 ha zu den größten zusammenhängenden Waldgebieten Deutschlands (<http://de.wikipedia.org/wiki/Unterlüß>). Auch beim Standort Unterlüß existieren für den Buchen- und Fichtenbestand bereits Daten zur jährlichen *in situ* Methanaufnahme (28). Der Boden hat einen hohen Sandanteil und wird als lehmiger Sand charakterisiert (28).

Tabelle 2: Charakteristika der untersuchten Waldstandorte

Standort	Baumart	Geographische Lage	Höhenlage [m]	MJT [°C] ^a	MJN [mm] ^b
Solling	Buche	51°46'N, 9°35'E	504	7,2	1038
	Fichte	51°46'N, 9°34'E	508	7,2	1038
Steigerwald	Buche	49°52'N, 10°28'E	425	7,5	725
	Fichte	49°52'N, 10°28'E	423	7,5	725
Unterlüß	Buche	52°50'N, 10°18'E	117	8,4	837
	Fichte	52°50'N, 10°17'E	115	8,4	837

^a mittlere jährliche Temperatur

^b mittlerer jährlicher Niederschlag

2.3 Probennahme

Die Probennahme im Solling erfolgte vom 30. Oktober bis 1. November 2006. Aufgrund technischer Probleme bei der GC-Analytik wurden am 5. Mai 2007 nochmals frische, kleine Bodenkerne geholt. Die Steigerwald-Probennahme fand am 25. und 26. Juni 2007 statt. Der Standort Unterlüß wurde am 22. und 23. Oktober 2007 beprobt.

Pro Standort und Waldtyp wurden unter Zuhilfenahme eines Stahlzylinders mit einsetzbaren Plexiglasröhren (Höhe: 30 cm, Durchmesser: 17 cm) und eines Druckluft-Bohrhammers (Cobra 148, Atlas Copco, Wien, Österreich) zehn Bodenkerne auf einer Fläche von ca. 1 ha im Abstand von jeweils 10-20 m gestochen. Die Plexiglasröhren wurden zum sicheren Transport der Bodenkerne anschließend von beiden Seiten mit Schaumstoff verschlossen. Etwa einen halben Meter neben diesen Kernen wurden mit Hilfe eines kleineren Stahlzylinders (Höhe: 20 cm, Durchmesser: 8 cm) und eines Kunststoffhammers fünf weitere Bodenkerne entnommen. Diese wurden für den Transport in Plastiktüten verpackt, die nicht verschlossen, jedoch zur Fixierung der Bodenkerne mit Klebeband umwickelt wurden. Zur Bestimmung des volumetrischen Wassergehalts des Mineralbodens zum Zeitpunkt der Probennahme wurden stählerne Stechzylinder (100 cm³ Volumen) mit einem Hammer in den zuvor von der organischen Auflage befreiten Mineralboden eingeschlagen. Diese wurden anschließend ausgegraben und für den Transport mit Plastikdeckeln und Klebeband fixiert. In Bayreuth wurden sämtliche Bodenproben bis zur weiteren Verarbeitung für maximal vier Tage bei 5°C im Dunkeln gelagert.

Vom Steigerwald wurde im Verlauf der Arbeit mehrmals frischer Boden geholt. Zum Ansetzen der MPNs (most probable number, 2.7) wurden am 2. Dezember 2008 drei Spatenstiche Boden jedes Bestandes entnommen. Für die Bestimmung des Einflusses der Baumwurzeln auf die atmosphärische Methanoxidation (2.5.4) wurden am 3. November 2008 und am 25. August 2009 fünf bzw. zehn Spatenstiche Boden jedes Bestands entnommen (ca. 0,5 m vom Stamm entfernt) und in Schuhkartons ins Labor transportiert. Das Manipulationsexperiment zur Untersuchung des Einflusses von β -Pinen (2.5.5) wurde ebenfalls mit Bodenproben vom 25. August 2009 angesetzt.

2.4 Probenaufbereitung

Die großen Bodenkerne wurden innerhalb von zwei Tagen nach Probennahme in horizontaler Lage in der Plexiglasröhre 6 cm nach unten geschoben, so dass oberhalb der Bodenoberfläche ein Gasraum von etwa 1,5 l entstand. Der entstandene Gasraum wurde vorübergehend mit Schaumstoff ausgefüllt. Eventuell vorhandene Wurzeln und Steine an der Unterseite der Bodenkerne wurden entfernt und die Fläche mit Hilfe eines Messers geglättet, so dass die Bodenkerne mit der Plexiglasröhre glatt abschlossen. Nach gründlicher Reinigung der Unterseite der Plexiglasröhren wurden die Bodenkerne mit der Unterseite nach oben in vertikale Lage gebracht und eine in Kunststoff gefasste Keramikplatte mit Dichtungsring und Entwässerungssystem aufgesetzt. Die Konstruktion wurde um 180° gedreht, der Schaumstoff

wurde entfernt und die Plexiglasröhren wurden mit einem Kunststoffdeckel inklusive Dichtungsring verschlossen.

Der äußerste Rand der kleinen Bodenkerne wurde innerhalb von vier Tagen nach Probennahme in senkrechter Position mit Hilfe eines Messers entfernt, da durch den Bohrvorgang Probenmaterial verschleppt worden war. Anschließend wurden die Bodenkerne in horizontaler Lage in fünf verschiedene Kompartimente unterteilt. Der O_i - und O_e -Horizont (Streu- und Fermentierungsschicht) wurden sauber abpräpariert, ebenso der dunklere O_a -Horizont (Humusschicht). Der darunter liegende Mineralboden wurde in drei 5 cm hohe Schichten unterteilt. Die Bodenproben wurden manuell homogenisiert. Durch Sieben der Bodenproben (2 mm Maschendurchmesser) wird die Struktur von Bodenaggregaten vermutlich stark geschädigt, was zu einem Verlust der methanotrophen Aktivität führt (Vorexperimente). Die homogenisierten Proben wurden in Plastiktüten verpackt, die bis zur weiteren Verwendung offen bei 5° gelagert wurden. Ein 50-ml-Aliquot wurde außerdem in sterilen Kunststoff-Zentrifugenröhrchen (Nunc, Langenselbold, Deutschland) für die molekularbiologischen Analysen sowie zur Bestimmung der Ammoniumkonzentration und des pH-Wertes bei -80°C tiefgefroren.

Als Vorbereitung zur Bestimmung des volumetrischen Wassergehalts der Standorte wurde der über die Stechzylinder ragende Boden entfernt und die Fläche mit Hilfe eines Messers geglättet, so dass ein sauberer Abschluss zwischen Bodenkern und Stahlzylinder entstand. Anschließend wurde der Stahlzylinder entfernt und der Boden gewogen.

Von den Bodenproben vom 2. Dezember 2008 wurden der O_a -Horizont und der 0-5 cm Mineralboden präpariert. Die Spatenstiche vom 3. November 2008 wurden am folgenden Tag im Labor in drei Kompartimente unterteilt: ca. 2 mm starke Wurzeln, Rhizosphäre (max. 1 cm Abstand zu den Wurzeln) und nicht durchwurzelter Boden. Die Wurzeln wurden für 2 h in Phosphatgepufferte Salinelösung gelegt (Tabelle 3) und dabei mehrmals geschwenkt, um an ihnen haftende Bodenteilchen schonend zu entfernen. Anschließend wurden sie auf einem sauberen Papiertuch zum Trocknen ausgelegt. Alle Proben wurden sofort weiter verwendet.

Die Spatenstiche vom 25. August 2009 wurden ähnlich behandelt. Es wurde jedoch besonders darauf geachtet, dass die Rhizosphärenproben wie auch die Proben des nicht durchwurzelter Bodens vom O_a -Horizont und oberen Mineralboden stammten. Auf die Präparation der Wurzeln wurde bei dieser Probennahme verzichtet. Die Fichtenproben wurden noch am Tag der Probennahme präpariert, um ein Verflüchtigen der Monoterpene zu verhindern. Jeweils 2 g Fichtenboden wurden sofort nach der Präparation der beiden Kompartimente in 25-ml-Braunglas-

Schottflaschen (Schott, Mainz, Deutschland) eingewogen und mit 10 ml Dichlormethan als Extraktionsmittel versetzt. Die Flaschen wurden gasdicht verschlossen und bei 2°C im Dunkeln gelagert.

Tabelle 3: Phosphat-gepufferte Salinelösung (178)

Komponente ^a	Einwaage auf 1 l	Endkonzentration
NaCl	8 g	136 mM
KCl	0,2 g	3 mM
Na ₂ HPO ₄	1,44 g	10 mM
KH ₂ PO ₄	0,24 g	2 mM

^a Die Komponenten wurden in 800 ml ddH₂O gelöst, der pH mit HCl auf 7,4 eingestellt, die Lösung auf 1 l aufgefüllt und autoklaviert.

2.5 Boden-Inkubationen

2.5.1 *In situ* Methanoxidation

Im Gegensatz zu den Standorten Solling und Unterlüß lagen für den Steigerwald keine Feldmessungen zur Methanoxidation vor. Aus diesem Grund wurde am 24. August 2007 einmalig mit Hilfe der Haubenmethode (closed chamber technique) die *in situ* Methanoxidationsrate im Buchen- und Fichtenbestand des Steigerwalds bestimmt (Abbildung 4). Hierzu wurden pro Waldtyp fünf Stahlhauben (Höhe: 20 cm, Durchmesser: 40 cm) mit einem Hammer ca. 3 cm tief in den Waldboden geschlagen (Gasraum: 19-24 l). Nachdem die Hauben verschlossen worden waren, folgte eine einstündige Inkubation, wobei alle 10 min Gasproben gezogen und in 20-ml-Glasröhrchen gesammelt wurden. Hierzu wurden die zuvor mit Argon gespülten Glasröhrchen mit Hilfe eines Dreiwegehahns und einer 50-ml-Kunststoffspritze zehn Mal mit der Gasatmosphäre unterhalb der Haube gespült. Bei jeder Probennahme wurden der aktuelle Luftdruck (DMG 2120 Tensimeter, Ballmoos, Horgen, Schweiz) und die Bodentemperatur bestimmt. Die Analyse der Methankonzentration erfolgte im Labor mittels GC-FID (2.6.5). Die Oxidation von atmosphärischem Methan stellt eine Reaktion erster Ordnung dar, d.h. die Reaktionsgeschwindigkeit ist nur von der Methankonzentration abhängig. Die Steigung des Logarithmus der Methankonzentrationen wird in solchen Reaktionen als Reaktionskonstante $k_{(app)}$ angegeben. Durch Multiplikation von $k_{(app)}$ mit der initialen Methankonzentration in der Gasphase

und dem Molekulargewicht von Methan ($16,04 \text{ g mol}^{-1}$) und anschließende Division durch die Bodenfläche kann die Methanoxidationsrate pro Flächen- und Zeiteinheit berechnet werden.



Abbildung 4: Haubenmethode zur Bestimmung der *in situ* Methanoxidationsrate

2.5.2 Methanoxidation intakter Bodenkerne

2.5.2.1 Mikrokosmenanlage

Die Messung der Methanoxidation intakter Bodenkerne erfolgte in einer Mikrokosmenanlage bei konstantem Gasfluss in einer 15°C -Klimakammer (Abbildung 5). Es wurden jeweils 20 Bodenkerne parallel vermessen. Über zwei Anschlüsse im Kunststoffdeckel der Mikrokosmen (2.4) konnte Methan einer definierten Konzentration kontinuierlich durch die Plexiglasröhren fließen. 20-ml-Glasröhrchen am Ausgang jedes Mikrokosmos ermöglichten die Gasentnahme und Analyse der Methankonzentration mittels GC-FID (2.6.5). Zur Erhöhung der Stabilität des Gasflusses befand sich am Ende jedes Mikrokosmos eine 10 cm hoch mit Wasser gefüllte 1-l-Glasflasche. Dadurch lag an jedem Mikrokosmos der gleiche Gegendruck an. Unterschiede in kleineren Widerständen, die durch unterschiedlich lange Schlauchverbindungen entstehen, konnten dadurch vernachlässigt werden. Die Gasflussrate wurde mit Hilfe eines Seifenblasenzählers am Ende der Wasserflaschen bestimmt und mittels Nadelventilen (SvageLok 316, Solon, OH, USA) auf $16 \pm 2 \text{ ml min}^{-1}$ adjustiert. Die Mikrokosmen wurden über den Kunststoffboden an eine Unterdruckpumpe (N75 KNDC, KNF Neuberger, Freiburg i.Br., Deutschland) angeschlossen.

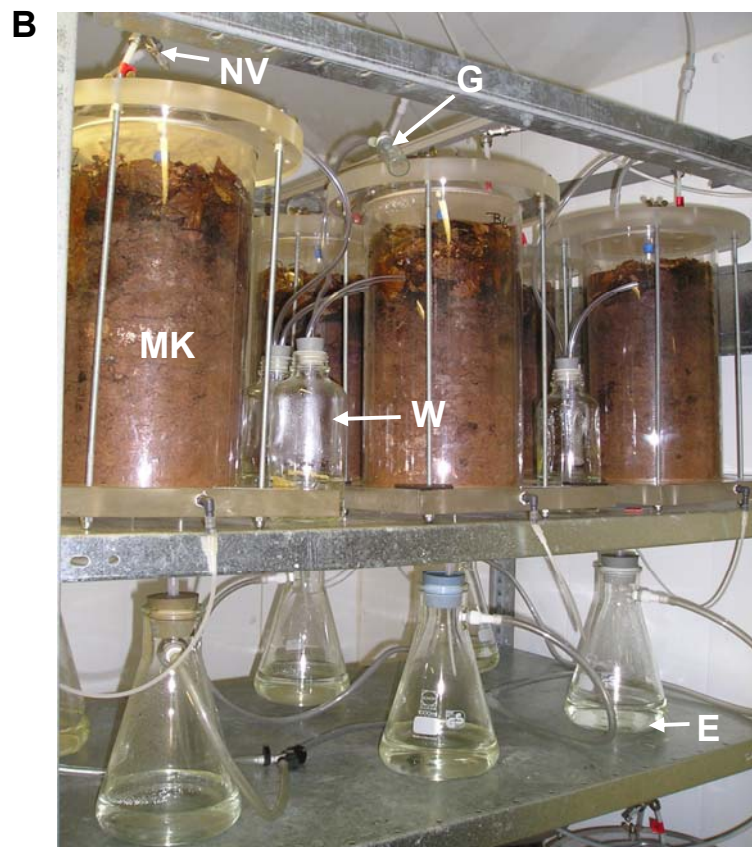
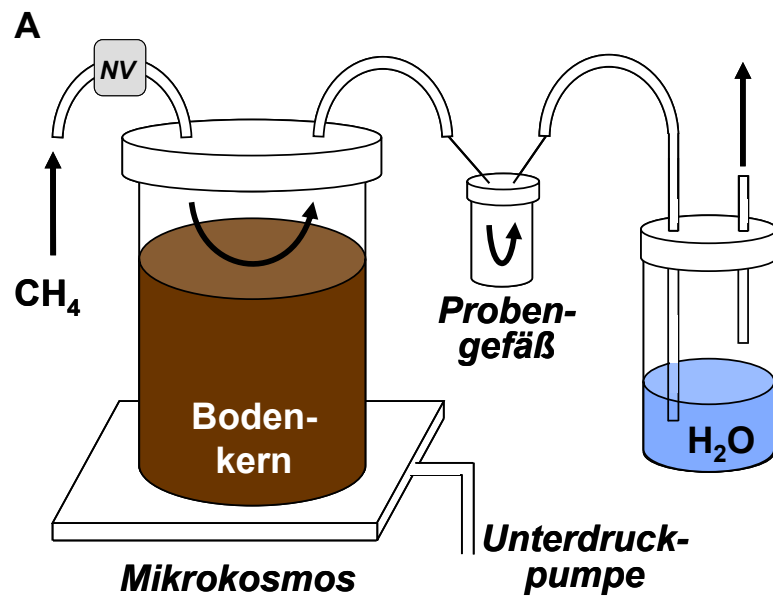


Abbildung 5: Schematischer Aufbau (A) und Fotografie (B) der Mikrokosmenanlage. NV, Nadelventil; G, Glasröhrchen zu Entnahme von Gasproben; MK, Mikrokosmos mit Bodenkern; W, Wasserflasche als Gegendruck; E, Erlenmeyerkolben zum Auffangen des dem Boden entzogenen Wassers

Durch Unterdruck wurde den Bodenkernen über die Keramikplatte und das in den Kunststoffboden eingebaute, spiralförmige Entwässerungssystem Wasser entzogen und alle Bodenkern auf das gleiche Matrixpotenzial eingestellt. Dies gewährleistete eine einheitliche Entwässerung des Grobporensystems der Bodenkern. Die einzelnen Elemente der Mikrokosmenanlage wurden über (Silikon-)Schläuche (Festo, Esslingen, Deutschland) und Kanülen (BD Microlance, Franklin Lakes, NJ, USA) verbunden. Durch die hohe Anzahl an Verbindungen bei der Mikrokosmenanlage können sehr leicht Gaslecks auftreten. Die Wasserflaschen ermöglichen eine Kontrolle der einzelnen Mikrokosmen. Bei Vorhandensein eines Gaslecks, ist der durch die Wassersäule entstandene Gegendruck zu hoch. Es steigen keine Luftblasen auf, da die Luft durch das Leck entweicht. Vor Beginn der Messungen wurden deshalb alle Steck- und Schraubverbindungen undichter Mikrokosmen mit Hilfe einer Seifenlösung überprüft und gegebenenfalls mit Teflonband abgedichtet.

Zur Berechnung der Methanoxidation pro Flächeneinheit der Bodenkern wurde Gleichung 1 aufgestellt. Danach ergibt sich die Konzentrationsänderung der Gase aus der Differenzbildung zwischen Mikrokosmeneingang und -ausgang.

Gleichung 1: Methanoxidationsrate intakter Bodenkern

$$O_{CH_4} = \frac{\Delta C_{CH_4} \times F_{Gas} \times M_{CH_4} \times T_0 \times p_{akt}}{A \times p_0 \times V_0 \times T_{akt}}$$

O_{CH_4} , Methanoxidationsrate [$g\ CH_4\ m^{-2}\ h^{-1}$]; ΔC_{CH_4} , Differenz zwischen der Eingangs- und Ausgangsmethankonzentration [ppb]; F_{Gas} , Gasfluss [$l\ h^{-1}$]; M_{CH_4} , Molmasse von Methan [$g\ mol^{-1}$] = 16,04 $g\ mol^{-1}$; T_0 , Temperatur unter Standardbedingungen [K] = 273,15 K; p_{akt} , aktueller Luftdruck [mbar]; A , Fläche des Bodenkerns [m^2] = 0,0227 m^2 ; p_0 , Druck unter Standardbedingungen [mbar] = 1013 mbar; V_0 , Molvolumen von Methan unter Standardbedingungen [ml] = 22,36 $l\ mol^{-1}$; T_{akt} , aktuelle Temperatur [K] = 288,15 K.

2.5.2.2 Methodenoptimierung

2.5.2.2.1 Aufbau und Technik

Nach Einbau der Bodenkern vom Solling in die Mikrokosmenanlage ergaben sich einige Probleme im Aufbau und der Versuchsdurchführung, die es zu lösen galt. Um die Haltbarkeit der Gummistopfen der 20-ml-Glasröhrchen zu verlängern, wurden für die Verbindungen zum Schlauchsystem zunächst Kanülen mit möglichst geringem Durchmesser verwendet. Überdruckmessungen an den Mikrokosmen zeigten jedoch, dass für einen konstanten Gasfluss

von 16 ml min^{-1} Kanülen mit einem Mindestdurchmesser von 0,8 mm nötig sind, damit kein Überdruck in den Mikrokosmen gebildet wird. Dies hatte jedoch Einfluss auf die Wahl der Gummistopfen zum Verschließen der Glasröhrchen. Werden diese für die Gasanalyse von 15°C nach Raumtemperatur überführt, entsteht durch Ausdehnen der enthaltenen Gase ein Überdruck. Stopfen aus starrem Gummi wurden durch die breiten Kanülen bereits nach mehrmaligem Einstechen undicht und mussten gegen flexiblere Stopfen getauscht werden.

Für die Messungen der atmosphärischen Methanoxideraten der Bodenkerne vom Solling wurde zum Begasen der Mikrokosmen abgepumpte Außenluft aus einem gebäudeinternen Gasanschluss verwendet („Hausluft“). Die Variabilität der Methankonzentration dieser „Hausluft“ war jedoch so groß wie die Unterschiede zwischen Eingangs- und Ausgangskonzentration der Mikrokosmen. Aus diesem Grund wurde die gewünschte Eingangskonzentration für die Bodenkerne der beiden anderen Standorte aus synthetischer Luft und Methanstandards (10 bzw. 1.000 ppm CH_4) mit Hilfe von Massenflusskontrollern (FC-260, 500 sccm, 50 sccm bzw. 1 slm, Tylan, Eching, Deutschland) und einer Stromquelle hergestellt. Die gewünschte Eingangskonzentration war dadurch stabil und unterlag keinerlei Variabilität.

2.5.2.2.2 *Matrixpotenzial*

Durch sukzessive Entwässerung der Bodenkerne sollte der Einfluss des Matrixpotenzials auf die atmosphärische Methanoxidation untersucht werden. Hierzu wurden die Bodenkerne über eine Beregnungsdüse im Deckel der Mikrokosmen über mehrere Tage hinweg mit jeweils 100 ml Leitungswasser beregnet, bis sich eine geschlossene Wasserschicht am Boden der Mikrokosmen gebildet hatte. Anschließend wurde das Matrixpotenzial von -6 kPa schrittweise auf -65 kPa verringert, was jeweils mehrere Tage dauerte, bis kein Wasser mehr aus den Bodenkernen kam. Die Oxidationsrate atmosphärischen Methans wurde bei verschiedenen Matrixpotenzialen bestimmt. Wider Erwarten sank jedoch die Methanoxiderate mit zunehmender Entwässerung der Bodenkerne um fast 50% und nahm auch bei gleich bleibendem Matrixpotenzial immer mehr ab. Die lange Lagerung oder die Beregnung der Bodenkerne hatte zur Abnahme der methanotrophen Aktivität geführt. Aus diesem Grund wurde der Einfluss des Matrixpotenzials auf die Methanoxidation nicht weiter untersucht, um eine schnelle Vermessung der Bodenkerne innerhalb von zwei Wochen gewährleisten zu können. Alle weiteren Messungen erfolgten bei einem Matrixpotenzial von -65 kPa.

2.5.2.3 Atmosphärische Methanoxidation und Michaelis-Menten-Kinetiken

Die Bestimmung der atmosphärischen Methanoxidationsraten der Bodenkerne erfolgte bei 1,8 ppm Methan als Eingangskonzentration. Für die Aufnahme der Michaelis-Menten-Kinetiken wurde die Methankonzentration von 0,3 bis 100 ppm Methan variiert. Nach Einstellen einer Konzentration konnte sich das System 24 h lang an die neue Konzentration anpassen, bevor die Gasproben entnommen wurden. Zunächst wurde die Konzentration von 1,8 ppm ausgehend in vier Schritten auf 0,3 ppm Methan reduziert. Anschließend wurde in acht Schritten auf 100 ppm Methan erhöht. Im Anschluss an die Messung bei 0,3 ppm und 100 ppm Methan wurde nochmals die Rate bei 1,8 ppm Methan bestimmt, um die Stabilität der methanotrophen Aktivität zu überprüfen.

2.5.2.4 Einfluss der organischen Auflage

Die Mikrokosmen wurden außerdem zur Untersuchung des Einflusses der organischen Auflage auf die Methanoxidation verwendet. Pro Standort und Baumtyp wurde von jeweils fünf Bodenkernen mit einem Esslöffel die organische Auflage entfernt. Die Methanoxidation bei 1,8 ppm Methan wurde vor und 24 h nach der Behandlung bestimmt.

Zunächst sollte auch das Methanoxidations- bzw. -produktionspotenzial der abgenommenen Auflagen untersucht werden. Hierzu wurde das abgenommene Auflagenmaterial der einzelnen Mikrokosmen in geschlossene Plexiglasbehälter überführt. Mit Hilfe einer Konstruktion aus Plastikspritze und Dreiwegehahn (siehe 2.5.1) wurden unter oxischen und anoxischen Bedingungen Gasproben entnommen. Unter oxischen Bedingungen wurde weder Methanoxidation noch -produktion der Auflagen verzeichnet. Aufgrund der großen Oberfläche des Auflagenmaterials gelang es jedoch nicht, durch Begasung mit Argon anoxische Bedingungen in den Plexiglasbehältern herzustellen. Die Analyse des Methanoxidations- bzw. -produktionspotenzials der organischen Auflagen erfolgte deshalb mit Probenaliquots wie unter 2.5.3 beschrieben.

2.5.3 Vertikale Verteilung der Methanoxidation und Ethylenproduktion

Zur Bestimmung der vertikalen Verteilung der Methanoxidation und Ethylenproduktion wurde frischer Boden (5 g organische Auflage bzw. 10 g Mineralboden) der fünf verschiedenen Bodenkompimente (2.3) in 120-ml-Serumflaschen eingewogen und die Flaschen mit Gummistopfen

und Aluminiumringen gasdicht verschlossen. Anschließend wurden die Flaschen für 10 min bei einem Gasfluss von 40 ml min^{-1} mit 1,8 ppm Methan begast, bevor ein Überdruck von ca. 150 mbar eingestellt wurde. Die Methan- bzw. Ethylenkonzentration wurde über einen Zeitraum von 72 h bei 15°C verfolgt. Hierzu wurden an neun Messzeitpunkten mit Hilfe einer gasdichten Spritze (Luer syringe, 2" Needle Length, Alltech, Rottenburg-Hailfingen, Deutschland oder Tuberculin syringe, 0,4x13mm, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) Gasproben entnommen und mittels GC-FID analysiert (2.6.5). Anschließend wurde die Atmosphäre der Serumflaschen durch zehnminütiges Begasen gegen Argon ausgetauscht und die Flaschen wiederum bei 15°C für 72 h inkubiert, um das Methanogenese- und Ethylenbildungspotenzial der Bodenproben unter anoxischen Bedingungen zu untersuchen.

Atmosphärisches Methan wurde mit einer Reaktionsgeschwindigkeit erster Ordnung abgebaut (vgl. 2.5.1). Die Methanoxidationsrate wurde durch Multiplikation der Reaktionskonstanten $k_{\text{(app)}}$ mit der initialen Methankonzentration berechnet und auf das Trockengewicht und die Zeiteinheit bezogen. Reaktionskonstanten mit einem Bestimmtheitsmaß $R^2 < 0,8$ wurden als methanoxidationsnegativ gewertet. Das nach 72 h akkumulierte Ethylen wurde ebenfalls auf das Trockengewicht der Bodenproben bezogen.

2.5.4 Einfluss der Baumwurzeln auf die Methanoxidation

Die atmosphärische Methanoxidationsrate in der Rhizosphäre im Vergleich zum nicht durchwurzelter Boden und den Wurzeln wurde an jeweils 10 g frischem Boden bzw. Wurzeln vom Steigerwald untersucht. Die Durchführung des Experiments erfolgte in 120-ml-Serumflaschen bei 1,8 ppm Methan und 15°C wie unter 2.5.3 beschrieben. Gasproben wurden stündlich über einen Zeitraum von acht Stunden analysiert.

2.5.5 Einfluss von β -Pinen auf die Expression der pMMO

Mit Hilfe eines Manipulationsexperiments und quantitativer PCR der *pmoA*-mRNA von USC α sollte der Einfluss von β -Pinen auf die Expression der pMMO untersucht werden. Durch Zugabe erhöhter Methankonzentrationen (100 ppm und 1% CH_4) sollte eine Steigerung der Expression der pMMO induziert werden, die in monoterpenhaltigen Proben reduziert oder gar verhindert wird.

Für das Experiment wurde eine Bodenaufschlammung aus 660 g Boden (O_a -Horizont und oberer Mineralboden, Buchenbestand Steigerwald, Probennahme 25. August 2009) und 1650 g sterilem ddH_2O in einer 2-l-PE-Flasche hergestellt und durch kräftiges Schütteln homogenisiert. Mit Hilfe eines Messzylinders wurden 80-ml-Aliquots der Bodenaufschlammung in 0,5-l-MK-Flaschen (Müller & Krempel, Bülach, Schweiz) abgefüllt und diese mit Gummistopfen und Aluminiumringen gasdicht verschlossen. Für beide Methankonzentrationen gab es triplicate Ansätze ohne β -Pinen bzw. mit dem 5- und dem 100-fachen der *in situ* β -Pinen-Konzentration von $0,0009 \mu\text{mol g}_{\text{TG}}^{-1}$ (141). Drei Replikate mit Argon als Atmosphäre ohne Monoterpenzugabe dienten als anoxische Kontrollen. Für jede Monoterpenkonzentration wurde außerdem ein Replikat ohne Boden vermessen, um gegebenenfalls, bei Ausbleiben eines Effekts von β -Pinen auf die Methanoxidation, eine mögliche Adsorption des Monoterpens an die Gummistopfen überprüfen zu können.

Die Applikation des Monoterpens (5-fach, 18,3 μl ; 100-fach, 366 μl) erfolgte mit Hilfe einer Glasspritze, die mit Dichlormethan gespült worden war. Anschließend wurden mit einer sterilen Einmalspritze Flüssigproben (1,5 ml) für die molekularbiologischen Analysen gezogen und in sterilen Reaktionsgefäßen (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) bei -80°C eingefroren. Mit der Zugabe von Methan und der Entnahme einer Gasprobe (direkte Injektion in den GC-FID zur Bestimmung der Methankonzentration, 2.6.5) wurde das Experiment gestartet. Im Verlauf des ersten Tages wurden alle zwei Stunden Flüssig- und Gasproben entnommen. Am Tag zwei und drei wurde nur einmal täglich beprobt. Zwischen den Beprobungen wurden die Bodenaufschlammungen auf einem Überkopfschüttler bei 20°C geschüttelt, um oxische Bedingungen aufrecht zu erhalten.

2.6 Analytische Methoden

2.6.1 Bodentextur

Die Analyse der Feinkörnung des Buchen- und Fichtenwaldbodens im Steigerwald erfolgte mit der Sieb- und Pipettenmethode nach Köhn und Köttgen (127). Hierbei wird die Sand-, Schluff-, und Tonfraktion eines Bodens bestimmt. Anhand des prozentualen Anteils jeder Fraktion kann anschließend mit Hilfe von Abbildung 6 die Bodentextur bestimmt werden.

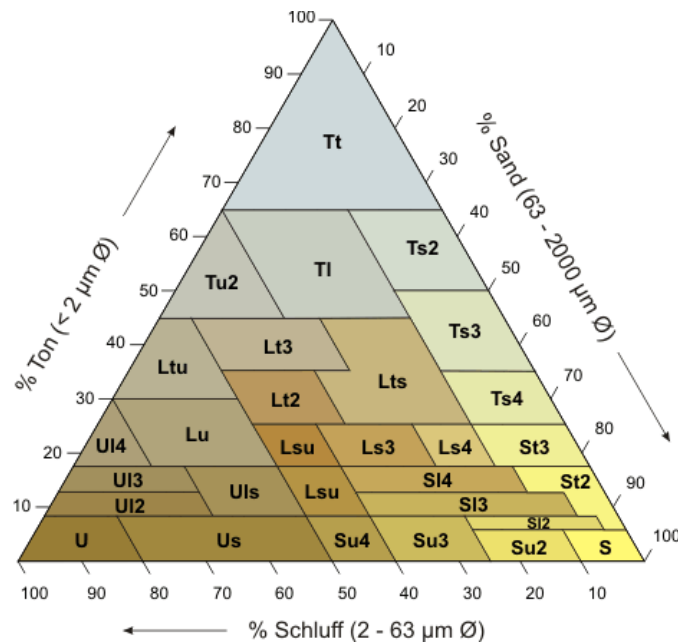


Abbildung 6: Dreieckskoordinatensystem der Feinkörnigkeit eines Bodens. S, Sand; s, sandig; U, Schluff; u, schluffig; L, Lehm; l, lehmig; T, Ton; t, tonig (<http://www.obib.de/Archaeologie/3eks.html>)

2.6.2 Trockengewicht und Wassergehalt

Zur Bestimmung des Trockengewichts einer Bodenprobe wurde diese gesiebt (2mm Maschendurchmesser), bei 60°C (organische Auflage) bzw. 105°C (Mineralboden) für mindestens 24 h in einem Trockenschrank getrocknet und anschließend gewogen (19). Zur Bestimmung des volumetrischen Wassergehalts einer Bodenprobe wurden Stechzylinder mit 100 cm³ Volumen verwendet. Der gravimetrische und volumetrische Wassergehalt der Bodenprobe wurde nach folgenden Formeln berechnet.

Gleichung 2: Gravimetrischer Wassergehalt

$$W_g = \frac{m_F - m_T}{m_T} \times 100\%$$

m_F , Feuchtgewicht des Bodens; m_T , Trockengewicht des Bodens; (19)

Gleichung 3: Volumetrischer Wassergehalt

$$W_v = \frac{V_w}{V_{\text{Gesamt}}} \times 100\%$$

V_w , Wasservolumen; V_{Gesamt} , Gesamtvolumen des Bodens; (19)

2.6.3 pH-Wert

Für jede Bodentiefe (2.4, Aliquots der fünf Flächenreplikate pro Standort wurden zuvor vereinigt) wurde der pH-Wert in wässriger (ddH₂O) und salzhaltiger (0,01 M CaCl₂-Lösung) Suspension bestimmt. Die Bodensuspensionen wurden im Verhältnis 1:5 (w/v) für die organische Auflage bzw. 1:2,5 (w/v) für den Mineralboden hergestellt. Nach fünfminütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Suspensionen aufgeschüttelt und direkt mit einer pH Glaselektrode (InLab414, Mettler Toledo, Greifensee, Schweiz) und einem pH-Meter (pH 90, Wissenschaftlich Technische Werkstätten, Weilheim, Deutschland) im Überstand vermessen, solange bis der pH-Wert mindestens 1 min lang konstant blieb.

2.6.4 Ammonium

Die zur pH-Messung (2.6.3) verwendeten, wässrigen Bodensuspensionen wurden für 10 min bei 12.100 x g zentrifugiert, der Überstand filtriert (0,2 mm Porendurchmesser, Celluloseacetat-Filtereinheit, Schleicher & Schuell Microscience, Dassel, Deutschland) und die Proben bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert. Die Ammoniumkonzentration in den Extrakten wurde mittels Fließinjektionsanalyse (flow injection analysis, FIA) mit einem FIA-LAB Analysesystem der Firma MLE (Dresden, Deutschland) bestimmt. FIA stellt eine Methode der Probenmanipulation in einem Schlauchsystem dar. Das Prinzip beruht auf der Injektion der Probe in einen kontinuierlichen Trägerstrom, wo es durch komplexe Diffusions- und Konvektionsprozesse zur Dispersion des Analyten kommt. Die Detektion von Ammonium erfolgte photometrisch bei 590 nm durch Gasdiffusion und Farbreaktion (191). Detektionslimit war 0,025 mg l⁻¹.

2.6.5 Gase

Die Analyse von Methan erfolgte mit zwei verschiedenen Systemen. Proben in 20-ml-Glasgefäßen (2.5.1, 2.5.2) wurden mit einem Shimadzu GC-14A Gaschromatographen (GC) vermessen, der mit einem Autosampler (DANI HSS 1000, EVES, Mommenheim, Deutschland) und einem Flammenionisationsdetektor (FID) ausgestattet war (141). Der GC war mit einer Porapak Q-Säule bestückt (80-100, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Säulen- bzw. Ofentemperatur war 65°C, Detektortemperatur 280°C. Als Trägergas diente Helium. Das Detektionslimit lag bei 100 ppm Methan. Zur Quantifizierung wurden die Software DANI Clarity Lite (EVES, Mommenheim, Deutschland) sowie zertifizierte Standards (0,3 / 0,8 / 1,3 / 2,0 / 10 / 1000 ppm Methan) verwendet.

Methan- und Ethylenproben bei 2.5.3, 2.5.4 und 2.5.5 wurden mit einer gasdichten Spritze (Luer syringe, 2" Needle Length, Alltech, Rottenburg-Hailfingen, Deutschland oder Tuberculin syringe, 0,4x13mm, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) entnommen und direkt in einen 5980 Series II Gaschromatographen der Firma Hewlett Packard (Palo Alto, CA, USA) injiziert, der mit einem FID ausgestattet war. Das Injektionsvolumen betrug 500 µl. Die Trennsäulen wurden von Alltech (Unterhaching, Deutschland) bezogen. Als Trägergas diente Helium mit einer Flussrate von 40 ml min⁻¹. Die Datenaufzeichnung erfolgte mit Hilfe der Software EuroChrom (Version V3.05, Knauer, Berlin, Deutschland). Die exakten Parameter der gaschromatographischen Analyse sind Tabelle 4 zu entnehmen.

Tabelle 4: Gaschromatographische Analyse bei manueller Probenapplikation

	CH₄^a	C₂H₄^b
Trennsäule	Molekularsieb 2 m x 1/2", 60-20	Poropak T 2 m x 1/8", 80-100
Ofentemperatur	60°C	80°C
Injektortemperatur	120°C	120°C
Detektortemperatur	150°C	150°C
Detektionslimit	100 ppm	100 ppm

^a nach (128, 140)

^b diese Arbeit

Auch zur Quantifizierung bei manueller Probenapplikation wurden zertifizierte Standards herangezogen (0,3 / 0,8 / 1,3 / 2,0 ppm Methan). Die Stoffmenge des Gases in der Gasphase basiert auf der idealen Gasgleichung (83) und wurde mit Gleichung 4 berechnet. Bei der Berechnung der Gaskonzentration in wässrigen Bodensuspensionen (2.5.5) musste zu n_{gas} zusätzlich die physikalisch gelöste Stoffmenge $n_{\text{gel,p}}$ (Gleichung 5) addiert werden. Der Bunsensche Löslichkeitskoeffizient für Methan bei 20°C beträgt 0,032 (18).

Gleichung 4: Stoffmenge eines Gases in der Gasphase

$$n_{\text{gas}} = V_{\text{Gasphase}} \times \frac{C \times T_0 \times p_{\text{akt}}}{p_0 \times V_0 \times T_{\text{akt}}} \times \frac{p_{\text{akt}} + p_{\text{Ü}}}{p_{\text{akt}}}$$

n_{gas} , Stoffmenge des Gases in der Gasphase [μmol]; V_{Gasphase} , Volumen der Gasphase [ml]; C , gemessene Gaskonzentration [ml l^{-1} bzw. ppm]; T_0 , Temperatur unter Standardbedingungen [K] = 273,15 K; p_0 , Druck unter Standardbedingungen [mbar] = 1013 mbar; V_0 , Molvolumen unter Standardbedingungen [ml] = 22.360 ml für Methan bzw. 22.246 ml für Ethylen; T_{akt} , aktuelle Temperatur [K] = 288,15 K; p_{akt} , aktueller Luftdruck [mbar]; $p_{\text{Ü}}$, Überdruck im Inkubationsgefäß [mbar]; basierend auf der idealen Gasgleichung (83)

Gleichung 5: Physikalisch gelöste Stoffmenge eines Gases

$$n_{\text{gel,p}} = V_{\text{fl}} \times \frac{C \times T_0 \times p_{\text{akt}}}{p_0 \times V_0 \times T_{\text{akt}}} \times \alpha \times \frac{p_{\text{akt}} + p_{\text{Ü}}}{p_{\text{akt}}}$$

$n_{\text{gel,p}}$, physikalisch gelöste Stoffmenge des Gases in der Flüssigphase [μmol]; V_{fl} , Volumen der Flüssigphase [ml]; α , Bunsenscher Löslichkeitskoeffizient (18); sonstige Abkürzungen siehe Gleichung 4; basierend auf der idealen Gasgleichung (83)

2.6.6 Trübung von Medien

Die Messung der Trübung von inokulierten Medien in Mikrotiterplatten erfolgte photometrisch bei 660 nm mit Hilfe eines μQuant Spektrophotometers der Firma BioTek (Winooski, VT, USA). Vor der Messung wurden die Platten zum Auflockern der Zellpellets 1 min lang in einem Flurimeter (FLx800, BioTek, Bad Friedrichshall, Deutschland) geschüttelt. Die Trübung wurde mit der BioTek-Software Gen5™ aufgenommen.

2.7 Most probable number technique (MPN)

Die Abundanz der kultivierbaren Methanotrophen sollte durch die MPN-Methode (most probable number) am Beispiel des Steigerwalds ermittelt werden (47). Diese Technik beruht auf der Bestimmung der höchstwahrscheinlichen Keimzahlen über die Fähigkeit der Mikroorganismen, in bestimmten Medien und Verdünnungsstufen zu wachsen. Zur Kultivierung methanotropher Bakterien wurden das NMS-Medium nach Whittenbury *et al.* 1970 und das M1-Medium nach Dedysh *et al.* 1998 verwendet.

Tabelle 5: NMS-Medium (215)

Komponenten	Einwaage auf 1 l	Endkonzentration
Basismedium		
KNO ₃	1,011 g	10,0 mM
KH ₂ PO ₄	0,953 g	7,0 mM
(Cycloheximid)	0,420g	1,5 mM
Spurenelementlösung^a		
HCl (37%)	4,140 ml	50,00 µM
FeCl ₂ x 4 H ₂ O	2,000 g	5,00 µM
ZnCl ₂	0,068 g	0,50 µM
MnCl ₂ x 2 H ₂ O	0,081 g	0,50 µM
H ₃ BO ₃	0,006 g	0,10 µM
CoCl ₂ x 6 H ₂ O	0,119 g	0,50 µM
CuCl ₂ x 2 H ₂ O	0,002 g	0,01 µM
NiCl ₂ x 6 H ₂ O	0,024 g	0,10 µM
Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O	0,031 g	0,15 µM
Magnesiumlösung^a		
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	96,280 g	0,80 mM
Calciumlösung^a		
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	11,100 g	0,10 mM

^a Die Einwaage bezieht sich auf die Stammlösungen, die Endkonzentration auf das fertige Medium

Die Komponenten des NMS-Basismediums wurden zunächst in 990 ml ddH₂O gelöst, der pH auf 6,8 eingestellt und das Medium mit ddH₂O auf 997 ml aufgefüllt. Für die Spurenelementlösung wurde zuerst FeCl₂ in HCl gelöst und dann die restlichen Komponenten zugefügt. Die übrigen Lösungen wurden entsprechend der Mengenangaben hergestellt und alle Lösungen getrennt voneinander autoklaviert. Zum Fertigstellen des Mediums wurden zum Basismedium je 1 ml der Spurenelement-, Magnesium- und Calciumlösung zugegeben. Die Zugabe von Cycloheximid, eines Translationsinhibitors bei Eukaryoten, zum Basismedium war optional, um dem Bewuchs der Medien mit eukaryotischen Pilzen vorzubeugen.

Die Herstellung des M1-Mediums erfolgte wie für das NMS-Medium beschrieben. Einziger Unterschied war, dass der pH des Mediums auf 5,5 eingestellt wurde. Die Zugabe von Cycloheximid zum Basismedium war auch hier optional.

Tabelle 6: M1-Medium (54)

Komponenten	Einwaage auf 1 l	Endkonzentration
Basismedium		
KNO ₃	1,00 g	10,0 mM
KH ₂ PO ₄	0,20 g	1,4 mM
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,10 g	0,4 mM
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	0,02 g	0,1 mM
(Cycloheximid)	0,42 g	1,5 mM
Spurenelementlösung^a		
EDTA	5,00 g	13,40 µM
FeSO ₄ x 7 H ₂ O	2,00 g	7,19 µM
ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	0,10 g	0,35 µM
MnCl ₂ x 4 H ₂ O	0,03 g	0,15 µM
CoCl ₂ x 6 H ₂ O	0,20 g	0,84 µM
CuCl ₂ x 5 H ₂ O	0,10 g	0,59 µM
NiCl ₂ x 6 H ₂ O	0,02 g	0,09 µM
Na ₂ MoO ₄	0,03 g	0,12 µM

^a Die Einwaage bezieht sich auf die Spurenelement-Stammlösung, die Endkonzentration auf das fertige Medium

Für die Ausgangsverdünnung (10^{-2}) der MPNs wurde in sterilen Erlenmeyerkolben 1 g frischer Boden (O_a -Horizont und 0-5 cm Mineralboden im Verhältnis 1:2 (w/w); drei Flächenreplikate pro Waldtyp zusammengefasst) mit 100 ml Medium (NMS bzw. M1) ohne Cycloheximid versetzt. Die Suspension wurde gründlich gevortext und für 1 min mit Ultraschall behandelt. Anschließend wurden Verdünnungsreihen von 10^{-3} bis 10^{-9} in 10-ml-Reagenzröhrchen angesetzt (je zwei Replikate pro Baumart und Medium, mit und ohne Cycloheximidzugabe, 16 Verdünnungsreihen insgesamt). Die Keimzahlen methanotropher Bakterien wurden bei 50 ppm und 10% CH_4 als Kohlenstoff- und Energiequelle bestimmt. Das jeweilige Medium war in sterilen Mikrotiterplatten vorgelegt (125 μ l pro Vertiefung). Pro Verdünnungsstufe wurden zehn Vertiefungen mit jeweils 25 μ l inokuliert. Eine weitere Vertiefung mit Medium, jedoch ohne Inokulation, diente als Kontrolle. Die Platten wurden in geschlossenen Plexiglastöpfen bei 30°C inkubiert. Unter die Platten gelegte, feuchte Papiertücher verhinderten das Austrocknen der Platten. Nach jedem Öffnen der Plexiglastöpfe wurden diese mit 70%-igem Ethanol ausgewischt, um einem Pilzbefall vorzubeugen. Die Platten wurden sofort nach Ansetzen, nach zwei Wochen und anschließend alle vier Wochen über einen Zeitraum von vier Monaten photometrisch vermessen (2.6.6). Vertiefungen mit Trübungen oberhalb derer der Kontrollen ohne Inokulation wurden als wachstumspositiv gewertet.

2.8 Molekularbiologische Methoden

2.8.1 Nukleinsäure-Präparation

2.8.1.1 DNA-Extraktion aus gefrorenen Bodenproben

Die Extraktion der DNA aus 0,3 g gefrorenem Boden (Buche: 0,1 g des O_a -Horizonts plus 0,2 g des 0-5 cm Mineralbodens; Fichte: 0,3 g des 0-5 cm Mineralbodens) erfolgte nach Stralis-Pavese *et al.* 2004 (197). Dieses Protokoll vereint enzymatisch-chemische und mechanische Zellyse (Bead Beating) mit Hilfe von Komponenten des Fast DNA Spin for Soil Kits (BIO101, Carlsbad, USA). Pro Bodenkern wurde dreimal DNA extrahiert (insgesamt 90 DNA-Extrakte). Die Abänderungen des Originalprotokolls sind im Folgenden aufgelistet.

- Lysepuffer I für die initiale Extraktion des Bodens enthielt zusätzlich 20 mg ml^{-1} Polyvinylpyrrolidon.
- Lysepuffer II für die Re-Extraktion des Bodens enthielt im Vergleich zu Lysepuffer I weder Polyvinylpyrrolidon noch Lysozym.

- Nach dem Waschschrift am Ende des Protokolls wurde das DNA-Pellet zur vollständigen Entfernung des Ethanol für 15 min bei 40°C getrocknet.
- Die Eluation der DNA erfolgte mit Tris HCl (pH 8,0).

2.8.1.2 RNA-Extraktion aus Flüssigproben

Für die Extraktion von RNA aus Flüssigproben wurden verschiedene Protokolle und Kits getestet. Mit Hilfe des MO BIO RNA PowerSoil Total RNA Isolation Kits (MO BIO Laboratories, Carlsbad, CA, USA) wird die RNA über Bead Beating aufgeschlossen und aufgereinigt. Bei der Koextraktion von DNA und RNA nach Griffiths *et al.* 2002 (78) werden die Nukleinsäuren nach einer mechanischen Lyse der Zellen mittels Bead Beating durch Extraktion mit Phenol, Chloroform und Isoamylalkohol von fettlöslichen Proteinen gereinigt und dann ausgefällt. Die anschließende Trennung von extrahierter DNA und RNA erfolgte mit Hilfe des Allprep DNA/RNA Mini Kits oder des RNA/DNA Mini Kits nach Herstellerangaben (Quiagen, Hilden, Deutschland).

2.8.1.3 *In vitro* Transkription von mRNA in cDNA

Mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase (RT) kann RNA in komplementäre, einzelsträngige cDNA transkribiert werden. Hierzu wurde das SuperScript® VILO™ cDNA Synthesis Kit (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) nach Herstellerangaben verwendet.

Tabelle 7: RT-Transkriptionsansatz

Komponenten	Volumen [µl]
5x VILO Reaction Mix	4
10x SuperScript Enzyme Mix	2
DEPC-H ₂ O	12
RNA	2

Die Transkription erfolgte in einem vorgeheizten Thermocycler (PeqLab Primus 96, PeqLab, Erlangen, Deutschland) nach folgendem Temperaturprogramm: 10 min Inkubation bei 25°C, anschließend 120 min bei 42°C und zum Abschluss 5 min bei 85°C, um die Reaktion zu beenden. Die cDNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20°C aufbewahrt.

2.8.1.4 *In vitro* Transkription von DNA in RNA

Mit Hilfe einer T7 RNA-Polymerase kann DNA in 5'-3'-Richtung in RNA transkribiert werden. Für die Reaktion wurde das T7 Transcription Kit von Fermentas benutzt (St. Leon-Rot, Deutschland). Der Transkriptionsansatz (Tabelle 8) wurde bei Raumtemperatur angesetzt. Die Transkription erfolgte durch zweistündige Inkubation bei 37°C und wurde durch 45-minütiges Einfrieren bei -20°C gestoppt. Im Anschluss wurde der gesamte Reaktionsansatz einem DNase-Verdau unterzogen, um restliche DNA zu beseitigen (2.8.1.5).

Tabelle 8: T7 Transkriptionsansatz

Komponenten	Volumen [µl]
5x Transcription Buffer	10,0
Ribolock Ribonuclease Inhibitor	2,0
dNTPs (10 mM)	10,0
DEPC-H ₂ O	16,5
Matrizen-DNA	10,0
T7 RNA Polymerase	1,5

2.8.1.5 DNase-Verdau

Lösungen, die einem DNase-Verdau unterzogen wurden, z.B. Transkriptionsansätze (2.8.1.4) oder RNA-Extrakte (2.8.1.2), wurden mit dem 0,12-fachen Volumen 10x Reaktionspuffer mit MgCl₂ und 1 bis 2 U DNase (1 U µl⁻¹, Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland) versetzt. Der Reaktionsansatz wurde mit DEPC-H₂O aufgefüllt und bei 37°C für 15 min inkubiert. Die Inaktivierung des Enzyms erfolgte durch Phenol-Chloroform-Extraktion. Nach Zugabe von einem Volumen Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1) wurde die Lösung 1 min lang gevortext und anschließend bei 4°C und 13.000 x g für 5 min zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde mit Chloroform-Isoamylalkohol (24:1) extrahiert. Für die Fällung der RNA wurde das 2,5-fache Volumen an 100%-igem Ethanol zugegeben, gevortext und für eine halbe Stunde bei -80°C inkubiert. Nach 10 min Zentrifugation wurde das RNA-Pellet mit eiskaltem 70%-igem Ethanol gewaschen und anschließend in DEPC-H₂O gelöst.

2.8.2 Bestimmung der Quantität und Qualität von Nukleinsäuren

2.8.2.1 Spektrophotometrische Messung

Die Bestimmung der Quantität und Qualität von Nukleinsäuren erfolgte spektrophotometrisch mit Hilfe eines NanoDrops ND-1000 (Peqlab Biotechnologie, Erlangen, Deutschland). Nukleinsäuren besitzen ihr Absorptionsmaximum bei 260 nm, wobei eine Absorptionseinheit einer DNA-Konzentration von $50 \mu\text{g ml}^{-1}$ bzw. einer RNA-Konzentration von $33 \mu\text{g ml}^{-1}$ entspricht (133). Aus den Koeffizienten A_{260}/A_{280} und A_{260}/A_{230} lässt sich außerdem die Reinheit der Nukleinsäurelösung abschätzen. Bei einer reinen DNA-Lösung liegt dieser Wert bei 1,8 bzw. oberhalb von 2,0. Ein niedrigerer Koeffizient deutet auf eine Kontamination der Nukleinsäuren durch Proteine bzw. Huminsäuren hin (133).

2.8.2.2 Quantifizierung mit Pico-/Ribo-Green

Die Verwendung von fluoreszierenden, interkalierenden Farbstoffen ermöglicht eine wesentlich sensitivere und exaktere Quantifizierung von doppelsträngigen Nukleinsäuren als die spektrophotometrische Bestimmung, da die Messung nicht durch koextrahierte Kontaminanten beeinflusst wird. Eine exakte Konzentrationsbestimmung ist besonders bei der Herstellung von DNA- und RNA-Standards für die quantitative Polymerase-Kettenreaktion (2.8.3.2) nötig. Das Quant-iT™ PicoGreen dsDNA Assay Kit sowie das Quant-iT™ RiboGreen RNA Assay Kit (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) wurden entsprechend den Herstellerangaben angewendet. Die Fluoreszenz des Farbstoffes bei 480 nm wurde nach dreiminütigem Schütteln mit Hilfe eines Flurimeters (FLx800, BioTek, Bad Friedrichshall, Deutschland) detektiert und mit der BioTek-Software Gen5™ dokumentiert.

2.8.3 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR) ermöglicht die spezifische Amplifikation von Genfragmenten (targets) aus komplexen Nukleinsäuregemischen (177). Das zu vervielfältigende Fragment wird dabei durch die die Zielsequenz flankierenden Oligonukleotide (Primer) definiert. Die PCR gliedert sich in drei Schritte, die in Zyklen wiederholt werden: Denaturierung der Matrizen-DNA (template), Anlagerung der Primer an die DNA-Einzelstränge (Annealing) und Elongation durch eine thermostabile DNA-Polymerase.

Die in dieser Arbeit eingesetzten Primer zur Amplifikation von 16S rRNA-Genfragmenten, Teilstücken funktioneller Gene (*pmoA*, *mmoX*, *pmoA* von *Verrucomicrobia* und *amoA*) und des Vektorinserts von Klonen sind in Tabelle 9 aufgelistet. Für alle PCR-Reaktionen wurde ein „Mastermix“ hergestellt, d.h. die in Tabelle 10 und Tabelle 12 angegebenen Volumina der benötigten Reagenzien wurden mit der Probenanzahl unter Berücksichtigung eines Pipettierverlusts von 10% multipliziert.

2.8.3.1 Konventionelle PCR

Konventionelle PCR-Reaktionen zur Amplifikation von Genfragmenten ohne Quantifizierung erfolgten je nach Primerkombination mit speziellen Temperaturprogrammen (Tabelle 11) in vorgeheizten Thermocyclern (Biometra Tgradient Thermoblock, Biotron, Göttingen, Deutschland; PeqLab Primus 96, PeqLab Biotechnologie, Erlangen, Deutschland; Peqstar, PeqLab Biotechnologie, Erlangen, Deutschland; Sensoquest Labcycler, Sensoquest, Göttingen, Deutschland).

Bei der Amplifikation von *pmoA* und *mmoX* wurden 50 ng DNA μl^{-1} als Template verwendet und die Taq Polymerase wurde erst nach der initialen Denaturierung der Matrizen-DNA zugefügt (Heißstart, Tabelle 10). Als Positivkontrolle für beide Assays diente genomische DNA von *Methylococcus capsulatus*. Die Primer A189f und A682r erfassen alle bekannten Methanotrophen mit Ausnahme der methanotrophen *Verrucomicrobia* (66, 102, 164). Auf Grund der Homologie der beiden Enzyme MMO und AMO werden mit diesem Primerpaar auch *amoA*-Gene ammonium-oxidierender β -*Proteobacteria* detektiert. Die Amplikonlänge für *pmoA* beträgt 531 bp, die für *mmoX* 719 bp.

Zum Nachweis der *pmoA1* und *pmoA2* methanotropher *Verrucomicrobia* in den untersuchten Waldböden wurden vier neue Primer entwickelt: Verruco29f, Verruco120f, Verruco391r und Verruco500r (Tabelle 9). Mit DNA-Extrakten aller Standorte als Template (50 ng DNA μl^{-1} ; triplikate DNA-Extrakte zusammengefasst) wurden PCR-Reaktionen durchgeführt mit verschiedenen Primer-Kombinationen, Annealing-Temperaturen von 50°C bis 70°C, mit und ohne Zugabe von 0,12% Rinderserumalbumin sowie als normale oder „nested“-PCR (zuerst Verruco29f/Verruco500r, anschließend Verruco120f/Verruco391r).

Tabelle 9: Sequenz, Schmelztemperatur, Zielgen und Position der verwendeten Primer.

Primer ^g	Sequenz (5'-3')	T _m [°C] ^a	Zielgen	Position	Referenz
A189f	GGN GAC TGG GAC TTC TGG	47-52	<i>pmoA</i> , universell	1-18 ^b	(94)
A682r	GAA SGC NGA GAA GAA SGC	42-51	<i>pmoA</i> , universell	514-531 ^b	(94)
USCα-346f	TGG GYG ATC CTN GCN C	42-55	<i>pmoA</i> , USCα	346-361 ^b	Diese Arbeit
C7-128r	CCA ATG GGG AGC CTA AAT	48	<i>pmoA</i> , C7	111-128 ^b	Diese Arbeit
Verruco29f	AAG AYM GRA TGT GGT G	34-44	<i>pmoA</i> , <i>Verrucomicrobia</i>	29-44 ^b	Diese Arbeit
Verruco120f	GCC YAT AGG WGC RAC MT	40-46	<i>pmoA</i> , <i>Verrucomicrobia</i>	120-136 ^b	Diese Arbeit
Verruco391r	GTC CAT AGT ATT CCA C	37	<i>pmoA</i> , <i>Verrucomicrobia</i>	376-391 ^b	Diese Arbeit
Verruco500r	ACD CCH CCN GCA AAR CT	35-53	<i>pmoA</i> , <i>Verrucomicrobia</i>	484-500 ^b	Diese Arbeit
mmoX206f	ATC GCB AAR GAA TAY GCS CG	45-59	<i>mmoX</i> , universell	187-206 ^c	(101)
mmoX886r	ACC CAN GGC TCG ACY TTG AA	50-56	<i>mmoX</i> , universell	886-905 ^c	(101)
amoA38f	AAT GGT GGC CGG TKG TNA C	49-50	<i>amoA</i> , universell	38-56 ^d	Diese Arbeit
amoA200r	GAC CAC CAG TAR AAD CCC C	46-50	<i>amoA</i> , universell	182-200 ^d	Diese Arbeit
27f	AGA GTT TGA TCM TGG CTC	46-48	16S rRNA, <i>Bacteria</i>	8-25 ^e	(129)
907mr	CCG TCA ATT CMT TTR AGT	42-44	16S rRNA, <i>Bacteria</i>	909-926 ^e	(129)
Eub341f	CCT ACG GGA GGC AGC AG	54	16S rRNA, <i>Bacteria</i>	341-357 ^e	(154)
Eub534r	ATT ACC GCG GCT GCT GG	54	16S rRNA, <i>Bacteria</i>	518-534 ^e	(154)
M13f	GTA AAA CGA CGG CCA G	46	Plasmidvektor, Multiple Klonie- rungsstelle	n.a. ^f	(148)
M13r	CAG GAA ACA GCT ATG ACC	47	Plasmidvektor, Multiple Klonie- rungsstelle	n.a. ^f	(148)
T7-Prom	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG	46	Plasmidvektor, T7 Promotor	n.a. ^f	Promega

^a Schmelztemperatur, berechnet mit der als freeware verfügbaren Software OligoCalc nach der nearest-neighbor-Methode (<http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html/>, (114).

^b Bezogen auf die *pmoA*-Sequenz von *Methylococcus capsulatus*

^c Bezogen auf die *mmoX*-Sequenz von *Methylococcus capsulatus*

^d Bezogen auf die *amoA*-Sequenz von *Nitrosospora briensis*

^e Bezogen auf die 16S rRNA Gensequenz von *Escherichia coli*

^f Nicht anwendbar

^g Vorwärts gerichtete Primer sind mit f gekennzeichnet, rückwärts gerichtete mit r.

Für die Herstellung von Standard-DNA zur Quantifizierung von *Bacteria* (2.8.3.2) wurde mit Hilfe der Primer 27f und 907mr ein 16S rRNA Genfragment aus genomischer DNA von *Escherichia coli* amplifiziert (Amplikonlänge: 926 bp). Die Primer M13f und M13r binden „up-“ und „down-stream“ des Inserts auf dem Klonierungsvektor und ermöglichen so eine Amplifikation des Inserts (Amplikonlänge für pCR®2.1-Vektor, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland: 199 bp plus Insertlänge). Als Template diente 1 µl Zellsuspension (2.8.6.3).

Tabelle 10: Reaktionsansätze zur Amplifikation von *pmoA*, *mmoX*, des 16S rRNA Gens und des Vektorinserts von Klonen

Reagenzien	Volumina für 50 µl PCR-Reaktionen [µl]			
	<i>pmoA</i> A189f / A682r	<i>mmoX</i> mmoX206f / mmoX886r	16S rRNA 27f / 907mr	Vektorinsert M13f / M13r
Master Amp PCR Premix F ^a	25	25	-	-
5 Prime MasterMix ^b			20	
Buffer B (10x) ^c	-	-	-	5
MgCl ₂ (25 mM) ^c	-	-	2	3
dNTPs (2mM) ^b	-	-	-	5
Vorwärtsprimer (10 µM)	2,5	2,5	2	1
Rückwärtsprimer (10 µM)	2,5	2,5	2	1
Rinderserumalbumin (3%)	-	-	2	
Taq Polymerase (5 U µl ⁻¹) ^d	-	-	-	0,2
PCR-H ₂ O	18,8	18,8	20	33,8
Matrizen-DNA	1	1	2	1

^a Epicentre, Madison, WI, USA

^b 5 Prime, Hamburg, Deutschland

^c Crystal (Bilatec, Mannheim, Deutschland)

^d *pmoA*, *mmoX* und 16S rRNA: Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland), Vektorinsert: Crystal, Bilatec (Mannheim, Deutschland)

Tabelle 11: Thermoprotokoll zur Amplifikation von *pmoA*, *mmoX*, des 16S rRNA Gens und des Vektorinserts von Klonen

	Temperatur / Zeit							
	<i>pmoA</i>		<i>mmoX</i>		16S rRNA		Vektorinsert	
Initiale Denaturierung	94°C	/ 5 min	94°C	/ 5 min	95°C	/ 5 min	94°C	/ 5 min
Denaturierung	94°C	/ 60 s	11x -1°C	94°C / 60 s	95°C / 60 s	5x	-	4x
Annealing	65-55°C	/ 60 s		56°C / 60 s	40°C / 60 s		-	
Elongation	72°C	/ 60 s		72°C / 60 s	72°C / 90 s		-	
Denaturierung	94°C	/ 60 s	24x	94°C / 60 s	95°C / 30 s	35x	94°C / 60 s	30x
Annealing	55°C	/ 60 s		59°C / 60 s	50°C / 30 s		54°C / 60 s	
Elongation	72°C	/ 60 s		72°C / 60 s	72°C / 90 s		72°C / 90 s	
End-Elongation	72°C	/ 10 min		72°C / 10 min	72°C / 5 min		72°C / 10 min	

2.8.3.2 Quantitative PCR

Die quantitative PCR (qPCR) ermöglicht die Quantifizierung eines Zielgens in (Umwelt-) Proben (38, 167). Der in dieser Arbeit verwendete PCR-Premix enthält den Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green I (Absorption: 494 nm, Emission: 521 nm), der in doppelsträngige DNA interkaliert. Bei Eintritt in die exponentielle Phase der PCR übersteigt die Fluoreszenz einen Schwellenwert C_q (32), der linear proportional zum Logarithmus der Ausgangskonzentration des Zielgens ist. Anhand von quantitativen Standards kann mit Hilfe einer linearen Regression das Zielgen in einem DNA-Extrakt quantifiziert werden.

Über die Spezifität der Amplifikation gibt die Schmelzkurvenanalyse Aufschluss. Hierbei wird die DNA aufgeschmolzen, indem die Temperatur kontinuierlich erhöht wird. Bei einer für das Fragment spezifischen Schmelztemperatur denaturiert der DNA-Doppelstrang. Der Fluoreszenzfarbstoff wird dadurch freigesetzt, was zu einer Abnahme der Fluoreszenz führt. So kann zwischen spezifischen Produkten und Primerdimeren unterschieden werden.

Alle qPCR-Reaktionen wurden in Triplikaten in 20 µl Reaktionsansätzen durchgeführt. Als Reaktionsgefäße dienten spezielle Bilatec PCR-Platten (Thermosprint 96 PCR plates, Bilatec, Mannheim, Deutschland), die mit transparenten Aufklebern verschlossen wurden (Thermosprint transparent sealing tapes, Bilatec, Mannheim, Deutschland). Zu 15 µl Mastermix, der sich aus den

jeweiligen Primern und dem iQTM SYBR[®] Green Supermix (Bio-RAD, Hercules, CA, USA) zusammensetzte, wurde 5 µl Matrizen-DNA gegeben, was einer Konzentration von 1-6 ng DNA pro Reaktionsansatz entsprach (Tabelle 12). Die DNA-Extrakte waren hierzu zwischen 250-fach und 1000-fach verdünnt worden. Die Amplifikation erfolgte je nach Primerkombination mit speziellen Temperaturprogrammen (Tabelle 13) in einem Bio-RAD iCycler mit iQ5 multicolor real-time PCR Detektionssystem. Für die Aufzeichnung und Analyse der Daten wurde die Software iQ5 optical system (Version 2.0, Bio-RAD, Hercules, CA, USA) benutzt.

2.8.3.2.1 Genotypspezifische Assays

Es wurden neue qPCR Assays zur Quantifizierung von USCα (Q-USCα), Cluster 7 (Q-C7) sowie der ammoniumoxidierenden *β-Proteobacteria* (Q-AOB) etabliert. Hierzu wurden neue Primer entwickelt: USCα-346f, C7-128r, amoA38f und amoA200r (Tabelle 9). USCα-346f und C7-128r stellen genotypspezifische Primer dar und wurden in Kombination mit herkömmlich verwendeten *pmoA*-Primern eingesetzt. Bakterien wurden mit Hilfe eines modifizierten Assays von Zaprasis und Mitarbeitern (219) quantifiziert (Tabelle 12). Die Amplikonlänge der Assays wurde zur Erhöhung der PCR-Effizienz sehr klein gehalten (128-193 bp). Die Etablierung eines qPCR-Assays zur Quantifizierung von Cluster 6 gelang nicht, da unspezifische Nebenprodukte während der PCR auftraten.

Die Quantifizierung des Zielgens erfolgt mit quantitativen Standards. Für den BACTERIA Assay wurde ein 16S rRNA Genfragment von *Escherichia coli* verwendet (2.8.3.1, Tabelle 9, Tabelle 10, Tabelle 11). Für die Assays Q-USCα, Q-C7 und Q-AOB wurden M13-PCR-Produkte entsprechender *pmoA* und *amoA* Kloninserts benutzt (2.8.6). Zur Überprüfung der Spezifität der neuen qPCR Assays wurden DNA-Fragmente herangezogen, die mindestens zwei Fehlpaarungen in der Zielregion der genotypspezifischen Primer aufwiesen (Non-Targets). Hierzu wurden *pmoA* Genfragmente der verschiedenen detektierten Genotypen sowie von *Methylococcus capsulatus* str. Bath benutzt. Für Q-USCα wurde die Spezifität des Assays zusätzlich durch Klonierung (TA Cloning Kit, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland, 2.8.6) aufgereinigter (PCR purification kit, Qiagen, Hilden, Deutschland, 2.8.5.2) qPCR-Produkte aus DNA-Extrakten bestätigt. Zehn Kloninserts wurden sequenziert. Alle zehn *pmoA* Sequenzen waren nah verwandt zu USCα.

2.8.3.2.2 Korrekturassay INHIB-CORR

Bei der Extraktion von DNA aus Bodenproben werden stets auch inhibitorische Substanzen, wie z. B. Huminsäuren, koextrahiert, die die PCR-Effizienz verringern und so zu unterschätzten Genzahlen führen. Aus diesem Grund wurde der Korrekturassay INHIB-CORR entwickelt, mit dessen Hilfe für jeden einzelnen DNA-Extrakt ein Faktor berechnet werden kann, der die mit den genotypspezifischen Assays gemessenen Genzahlen um auftretende Inhibitionseffekte korrigiert.

Als Standard-DNA für diesen Assay und Inhibitions-Kontroll-DNA diente die mit den Primern M13f und M13r amplifizierte Vektorregion des Plasmids pCR®2.1 (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) ohne DNA-Insert. Jeder DNA-Extrakt wurde mit $0,2 \times 10^4 \mu\text{l}^{-1}$ dieser Inhibitions-Kontroll-DNA versetzt und sowohl mit den genotypspezifischen Assays als auch mit INHIB-CORR vermessen. Vorversuche zeigten, dass der Zusatz von Inhibitions-Kontroll-DNA zu einem DNA-Extrakt keinen negativen Einfluss auf die Amplifikationseffizienz mit den genotypspezifischen Assays hatte.

Die mit den genotypspezifischen Assays gemessenen Werte für den Logarithmus der Anfangskonzentration des Zielgens wurden sowohl um den mit INHIB-CORR berechneten Inhibitionsfaktor als auch um den Unterschied in der Amplifikationseffizienz zwischen den genotypspezifischen Assays und INHIB-CORR korrigiert (Gleichung 6, diese Arbeit). Dabei wurde darauf geachtet, die DNA-Extrakte so zu verdünnen, dass der Inhibitionsfaktor unterhalb von zwei lag, da bei einer Inhibition von mehr als 100% keine lineare Beziehung zwischen Inhibition und DNA-Konzentration vorlag.

Gleichung 6: Korrigierter Logarithmus der Ausgangskonzentration des Zielgens

$$\lg(SQ)_{\text{korrigiert}} = \lg(SQ)_{\text{gemessen}} \times (\lg(SQ)_{\text{INHIB-CORR}_{\text{soil}}} / \lg(SQ)_{\text{INHIB-CORR}_{\text{ist}}}) \times (E_{\text{Assay}} \div E_{\text{INHIB-CORR}})$$

$\lg(SQ)_{\text{gemessen}}$, lg der mit den genotypspezifischen Assays gemessenen Ausgangskonzentration des Zielgens; $\lg(SQ)_{\text{INHIB-CORR}_{\text{soil}}}$, lg der zugefügten Inhibitionskontroll-Konzentration = 4; $\lg(SQ)_{\text{INHIB-CORR}_{\text{ist}}}$, lg der mit INHIB-CORR gemessenen Inhibitionskontroll-Ausgangskonzentration; E_{Assay} , Amplifikationseffizienz der genotypspezifischen Assays; $E_{\text{INHIB-CORR}}$, Amplifikationseffizienz von INHIB-CORR

Tabelle 12: Reaktionsansätze der qPCR Assays Q-USC α , Q-AOB, BACTERIA, Q-C7 und INHIB-CORR

Reagenzien	Volumina für 20 μ l PCR-Reaktionen [μ l]				
	Q-USC α ^a	Q-AOB ^a	BACTERIA ^b	Q-C7 ^a	INHIB-CORR ^a
	USC α -346f / A682r	amoA38f / amoA200r	Eub341f / Eub534r	A189f / C7-128r	T7-Prom / M13r
iQ TM SYBR [®] Green Supermix ^c	10	10	10	10	10
Vorwärtsprimer (10 μ M)	1	2	0,5	1	1
Rückwärtsprimer (10 μ M)	1	2	0,5	1	1
PCR-H ₂ O	3	1	4	3	3
Matrizen-DNA	5	5	5	5	5

^a Diese Arbeit^b (219)^c Bio-RAD, Hercules, CA, USA**Tabelle 13:** Thermoprotokoll für die qPCR-Assays Q-USC α , Q-AOB, BACTERIA, Q-C7 und INHIB-CORR

	Temperatur / Zeit			
	Q-USC α ^a	Q-AOB ^a	BACTERIA ^b	Q-C7 / INHIB-CORR ^a
Initiale Denaturierung	95°C / 8 min	95°C / 8 min	95°C / 8 min	95°C / 8 min
Denaturierung	95°C / 30 s	95°C / 30 s	95°C / 30 s	95°C / 30 s
Annealing	57,3°C / 15 s	50°C / 20 s	55,7°C / 25 s	61,2°C / 15 s
Elongation ^c	72°C / 15 s	72°C / 20 s	72°C / 25 s	72°C / 15 s
Schmelzkurve	70 - 95°C / 10 s , 51x (+ 0,5°C)			

^a Diese Arbeit^b (219), modifiziert^c Die Aufnahme der Fluoreszenz erfolgte während der Elongation. Die Schmelzkurvenanalyse brachte keinen Hinweis auf gebildete Primerdimere.

Tabelle 14: Amplikonlänge, Amplifikationseffizienz und Detektionslimit der qPCR Assays Q-USC α , Q-AOB, BACTERIA, Q-C7 und INHIB-CORR

qPCR-Assay	Amplikonlänge [bp]	Amplifikationseffizienz [%]	Detektionslimit [Gene pro Reaktion]
Q-USC α ^a	185	85	10 ¹
Q-AOB ^a	164	87	10 ²
BACTERIA ^b	193	97	10 ²
Q-C7 ^a	128	94	10 ¹
INHIB-CORR ^a	178	88	10 ²

^a Diese Arbeit^b (219), modifiziert

2.8.4 Agarose-Gelelektrophorese

Zur qualitativen Überprüfung von PCR-Produkten diente eine horizontale Agarose-Gelelektrophorese, bei der Nukleinsäuren in Abhängigkeit ihrer Größe in einem Spannungsfeld aufgetrennt werden (1, 178). Hierzu wurden 1%-ige (w/v) Gele aus Agarose und 1 x TAE-Puffer (Tris-HCl, 40 mM; Eisessig, 20 mM; EDTA, 1 mM), der auch als Laufpuffer diente, hergestellt. Das Agarose-Puffer-Gemisch wurde bis zum vollständigen Auflösen der Agarose erhitzt, die Lösung auf 60°C abgekühlt und Ethidiumbromid (50 ng ml⁻¹ Endkonzentration, Bio-Rad, Hercules, USA) zur Visualisierung der DNA zugegeben. Die Gele wurden luftblasenfrei in eine Gelgießschale mit Gelkämmen gegossen und nach ihrer Aushärtung in die Elektrophoresekammer überführt (Techne, Burkhardtsdorf, Deutschland). Die Proben wurden mit 6 x Ladepuffer (9 mM Orange G, 0,45 mM Bromphenolblau, 0,56 mM Xylencyanol FF, 1,6 M Glycerin, 10 mM Tris-HCl, 50 mM EDTA, pH 7,5) versetzt und in die Taschen des Agarose-Gels pipettiert. Als Längenstandard wurde der Marker MWM1 (200-10.000 bp; Bilatec, Viernheim, Deutschland) verwendet. Je nach Größe des Agarose-Gels wurde die Elektrophorese bei einer Spannung von 90 V bis 160 V durchgeführt. Die Detektion der DNA-Banden erfolgte durch UV-Bestrahlung bei 302 nm mit Hilfe eines Transilluminators (UVT-20M, Herolab, Wiesloch, Deutschland). Mittels eines Videodokumentationssystems (Canon Powershot G5 mit Band Pass Filter, Canon Deutschland, Krefeld, Deutschland) und der dazugehörigen Software Remote Capture wurden die Gele fotografiert.

2.8.5 Aufreinigung von PCR-Produkten

2.8.5.1 Gelaufreinigung

Für die Aufreinigung von PCR-Produkten aus Agarose-Gelen bei Auftreten von unspezifischen Nebenprodukten wurde TAE Puffer (40 mM Tris-Acetat, 0,1 mM Na₂EDTA, pH 8,0) der Firma Millipore (Millipore, Bedford, USA) verwendet. Ansonsten wurde die Elektrophorese durchgeführt wie unter 2.8.4 beschrieben. Nach der fotografischen Dokumentation der Agarose-Gele wurden die gewünschten Banden mit einem sauberen Skalpell ausgeschnitten und die DNA mit einem Gelextraktionskit (Montage Gel Extraction Kit, Millipore, Bedford, USA) nach Herstellerangaben aufgereinigt.

2.8.5.2 Direkte Aufreinigung von PCR-Produkten

PCR-Produkte, bei denen keine unspezifischen Nebenbanden auftraten, wurden mit dem PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland, bei geringer Probenzahl) oder mit einem Platten-Filtersystem (Millipore PCR96 Cleanup Plates, Millipore Corporation, Bedford, USA, bei großer Probenzahl) nach Herstellerangaben aufgereinigt.

2.8.6 Klonierung und Sequenzierung

Unter Klonierung versteht man das Einbringen von Fremd-DNA in einen Vektor (meist ein Plasmid) (178, 218). Der Vektor samt Fremd-DNA wird anschließend in einen Wirtsorganismus (meist *Escherichia coli*) eingeschleust und mit dessen Hilfe vervielfältigt. In der entstandenen Genbibliothek sind die in einer DNA-Probe enthaltenen, unterschiedlichen DNA-Fragmente in Form von Klonen repräsentiert. Eine Klonierung wird in Ligation, Transformation und Klonscreening unterteilt.

Die Genbibliotheken wurden aus technischen Gründen von der Firma Agowa (Berlin, Deutschland) erstellt (Klonierung inklusive Sequenzierung). Für die Erstellung von qPCR-Standards wurden die gewünschten Genotypen mit den Primern der qPCR-Assays aus den DNA-Extrakten amplifiziert und wie im Folgenden aufgeführt kloniert (TA Cloning, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland). Die klonierten Genfragmente wurden anschließend von Macrogen (Seoul, Südkorea) sequenziert.

2.8.6.1 Ligation

Bei der Ligation mittels des TA Cloning Kits wird das zu klonierende PCR-Produkt (Insert) mit Hilfe der T4 DNA-Ligase in die Multiple Klonierungsstelle (MCS) des linearisierten Vektors eingebracht. Das Plasmid besitzt neben einer Ampicillinresistenz und die MCS flankierenden Primerbindungsstellen zudem das Gen *lacZ*, das für die β -Galaktosidase kodiert. Da die MCS innerhalb dieses Gens liegt, geht bei erfolgreichem Einbau eines Inserts die β -Galaktosidase-Aktivität verloren.

Pro Ligationsansatz wurden die in Tabelle 15 aufgeführten Reagenzien zusammenpipettiert, gründlich gemischt und bei 14°C über Nacht inkubiert. Die beste Ligationseffizienz wird laut Herstellerangaben bei einem Insert:Vektor-Verhältnis von 1:1 erzielt.

Tabelle 15: Ligationsansatz

Reagenzien	Volumen [μ l]
PCR-Produkt	1-6
10x Ligation Buffer	1
pCR®2.1 Vector (25 ng μ l ⁻¹)	2
T4 DNA Ligase	1
PCR-H ₂ O	ad 10

2.8.6.2 Transformation

Zur Vervielfältigung des inserthaltigen Plasmids wurde es in kompetente *Escherichia coli* Zellen transformiert (One Shot TOP10 Chemically Competent *E. coli*, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland). Hierzu wurden die bei -80°C gelagerten Zellen (50 μ l pro Reaktionsgefäß) auf Eis aufgetaut und vorsichtig 2 μ l Ligationsansatz untergerührt. Nach einer 30-minütigen Inkubation des Ansatzes auf Eis zur Adsorption der Plasmide an die Zellen erfolgte für 30 s ein Hitzeschock bei 42°C. Dies führt zur Permeabilisierung der Zellmembranen und zur Aufnahme des Plasmids in die Zellen. Die Reaktionsgefäße wurden unverzüglich zurück auf Eis transferiert und 250 μ l des im Kit enthaltenen S.O.C. Mediums zugefügt. Bei einer einstündigen Inkubation bei 37°C und 225 U min⁻¹ konnten die Zellen die Ampicillinresistenz ausbilden und anschließend mit Hilfe eines Drigalsky-Spatels auf bei 37°C vorgewärmte LB/Amp/IPTG/X-Gal-Platten ausplattiert werden. Die Platten

wurden über Nacht bei 37°C zur Ausbildung der Kolonien inkubiert und anschließend bei 4°C gelagert.

Tabelle 16: LB/Amp/IPTG/X-Gal-Platten

Komponente	Einwaage auf 1 l	Endkonzentration
Trypton ^a	10 g	1,0%
Hefeextrakt ^a	5 g	0,5%
NaCl ^a	5 g	85 mM
Agar ^a	15 g	1,5%
Ampicillin ^b	100 g	270 mM
IPTG ^b	120 g	0,5 mM
X-Gal ^b	50 g	196 mM

^a nach Zugabe dieser Komponenten wurde der pH auf 7,0 eingestellt, die Lösung mit ddH₂O auf 997 ml aufgefüllt und autoklaviert.

^b Die Einwaage bezieht sich auf sterilfiltrierte (Porendurchmesser: 2 µm) Stammlösungen, die nach dem Autoklavieren des Mediums zugefügt wurden (je 1 ml jeder Stammlösung). Die Endkonzentration bezieht sich auf das fertige Medium.

2.8.6.3 Klonscreening

Auf den ampicillinhaltigen Platten können nur Klone wachsen, die ein Plasmid aufgenommen haben und somit über das Gen für die Ampicillinresistenz verfügen. Desweiteren ermöglicht die Methode des Blau/Weiß-Screenings eine Identifikation der Klone, die ein Plasmid mit Insert enthalten. Bei insertpositiven Klonen geht die β -Galaktosidase-Aktivität verloren und das im Medium enthaltene, farblose X-Gal kann nicht in den blauen Farbstoff 5-Brom-4-Chlor-Indigo umgewandelt werden. Diese Klone bleiben somit weiß. Klone, die ein Plasmid ohne Insert aufgenommen haben, färben sich dagegen blau. Weiße Klone wurden mit Hilfe steriler Zahnstocher in 96er PCR-Platten mit 20 µl vorgelegtem PCR-H₂O transferiert. Diese Zellsuspension diente als Matrize für die Vektorinsert-PCR (Tabelle 10, Tabelle 11). Durch anschließende Agarose-Gelelektrophorese (2.8.4) können Klone mit der richtigen Insertlänge (2.8.3) identifiziert werden. Klone mit dem richtigen Insert wurden aufgereinigt (2.8.5.2) und sequenziert (Macrogen, Seoul, Südkorea).

2.8.7 Phylogenetische Analysen und Primerdesign

Die Analyse von *pmoA/amoA*-Genfragmenten erfolgte mit dem Softwarepaket ARB (<http://www.arb-home.de/>) (137) und der Software MEGA4 (199). Das Primerdesign erfolgte ebenfalls in ARB mit Hilfe des Tools „Probe Match“. Das Online-Tool „Blast“ wurde zur Überprüfung der Ähnlichkeit der Sequenzen zu bereits vorhandenen Datenbankeinträgen in Genbank, der Sequenzdatenbank des National Center for Biotechnology Information, herangezogen (blastn, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) (17). Referenzsequenzen wurden ebenfalls von Genbank herunter geladen (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

2.8.7.1 Berechnung eines distanzbasierten Richtwerts („Cut-Off“) zur Differenzierung von methanotrophen OTUs auf Artenebene

Von 22 methanotrophen Reinkulturen wurden die entsprechenden 16S rRNA und *pmoA*-Genfragmente von der Sequenzdatenbank GenBank heruntergeladen (Tabelle 17), in ARB homologisiert (aligned) und die *pmoA*-Genfragmente *in silico* in die zugehörige Proteinsequenz translatiert. Durch einen paarweisen Vergleich aller *pmoA* (DNA), PmoA (Protein) bzw. 16S rRNA Genfragmente mit Hilfe einer Distanzmatrix konnte der Nukleotid- bzw. Aminosäureunterschied *D* zwischen den einzelnen Sequenzen kalkuliert werden (92). Ausgehend von *D* erfolgt die Berechnung der Ähnlichkeit der Sequenzen zueinander (Gleichung 7). Die prozentuale Sequenzähnlichkeit der einzelnen *pmoA*- bzw. PmoA-Sequenzpaare wurde anschließend gegen die der 16S rRNA Sequenzpaare aufgetragen.

Gleichung 7: Nukleotid- bzw. Aminosäureähnlichkeit *S* zwischen zwei Sequenzen

$$S = 1 - D$$

D, Nukleotid- bzw. Aminosäureunterschied zwischen zwei Sequenzen

Der in (3.5.1) berechnete Sequenzunterschied zur Unterscheidung von methanotrophen OTUs (operational taxonomic units) auf Artenebene wurde mit Hilfe von DOTUR (180) auf 406 PmoA-Sequenzen innerhalb der Cluster USCα (95), 5 (88), MHP (36), AC (im Rahmen dieser Arbeit benannt) und *Methylocapsa acidiphila*-verwandte Sequenzen angewendet. Für die Analyse wurden die Aminosäuren 59 bis 206 (in Bezug auf die PmoA von *Methylococcus capsulatus* str.

Bath, NC_002977) berücksichtigt. Die Erstellung eines Dendrogramms erfolgte in MEGA4 mit der distanzbasierten „Neighbor-Joining“-Methode. Auf eine Evolutionskorrektur wurde in Anlehnung an das OTU-Konzept verzichtet.

Tabelle 17: „Accession Numbers“ der bei der Berechnung des distanzbasierten Richtwerts zur Differenzierung von OTUs auf Artenebene verwendeten *pmoA*- und 16S rRNA Gensequenzen methanotropher Isolate

Stamm	<i>pmoA</i>	16S rRNA
<i>Clonothrix fusca</i> str. AW-b	DQ984192	DQ984190
<i>Methylobacter psychrophilus</i>	AY945762	AF152597
<i>Methylobacter tundripaludum</i> str. SV96T	AJ414658	AJ414655
<i>Methylocaldum gracile</i>	U89301	U89298
<i>Methylocaldum szegediense</i>	U89303	U89300
<i>Methylocaldum tepidum</i>	U89304	U89297
<i>Methylocapsa acidiphila</i> str. B2	AJ278727	AJ278726
<i>Methylococcus capsulatus</i>	L40804	X72770
<i>Methylocystis heyeri</i> str. H2	AM283546	AM283543
<i>Methylocystis hirsuta</i> str. CSC1	DQ364434	DQ364433
<i>Methylocystis parvus</i>	U31651	AF150805
<i>Methylocystis rosea</i> str. SV97	AJ414657	AJ414656
<i>Methylohalobius crimeensis</i> str. 10Ki	AJ581836	AJ581837
<i>Methylomicrobium japanense</i>	AB253367	D89279
<i>Methylomonas methanica</i>	EU722434	AF150806
<i>Methylosarcina fibrata</i> str. AML-C10	AF177325	AF177296
<i>Methylosarcina lacus</i> str. LW14	AY007286	AY007296
<i>Methylosarcina quisquiliarum</i> str. AML-D4	AF177326	AF177297
<i>Methylosinus sporium</i>	DQ119048	M95665
<i>Methylosinus trichosporium</i> str. BF1	AJ868409	AJ868424
<i>Methylosoma difficile</i> str. LC2	DQ119047	DQ119050
<i>Methylothermus thermalis</i> str. MYHT	AY829010	AY829009

2.8.7.2 Genbibliotheken

Die bei der Sequenzierung erhaltenen *pmoA*-/*amoA*-Genfragmente sowie die mit Hilfe von Blast ermittelten nächst-verwandten Sequenzen wurden in eine bereits bestehende ARB-Datenbank importiert, aligned und *in silico* translatiert. Zur Stammbaumberechnung wurde die „Maximum-Likelihood“-Methode „PROML“ zusammen mit dem Evolutionskorrekturmodell JTT (Jones-Taylor-Thornton-Modell) (108) angewendet. In die Analyse gingen die Aminosäuren 59 bis 206 ein (in Bezug auf die PmoA von *Methylococcus capsulatus* Bath, NC_002977).

Die in dieser Arbeit gewonnenen Gensequenzen wurden der öffentlich zugänglichen Datenbank des European Molecular Biology Laboratory des European Bioinformatics Institute (<http://www.ebi.ac.uk/embl/>) zur Verfügung gestellt. *pmoA*-Genfragmente von USCα wurden unter den „Accession Numbers“ FN564572 – FN564868 hinterlegt. Die *pmoA*-/*amoA*-Gensequenzen von Cluster 6 sind unter FN564869 – FN564890 zu finden. *amoA*-Sequenzen sind unter FN564891 – FN564929 abgelegt. Die *pmoA*-/*amoA*-Sequenzen von Cluster 7 haben die „Accession Numbers“ FN564930-FN564934.

2.8.8 Diversitätsanalysen

Sämtliche Diversitätsanalysen wurden unter Ausschluss der erhaltenen *amoA*-Gensequenzen durchgeführt, da diese vorrangig an einem Standort auftraten, der sich somit bei allen nachfolgenden Tests stark von den anderen unterschieden hätte.

2.8.8.1 Rarefaction

Rarefaction ist in der Ökologie eine gängige Technik, um die Diversität von Proben mit unterschiedlichem Erfassungsaufwand zu standardisieren und zu vergleichen, in diesem Fall Genbibliotheken mit unterschiedlicher Anzahl an Sequenzen. Es lässt sich außerdem die zu erwartende Artenanzahl einer Probe abschätzen (77, 87). Die in dieser Arbeit verwendete Methode, die Hurlbert-Rarefaction (100), wurde mit Hilfe des Freeware-Tools „aRarefact“ (<http://www.uga.edu/~strata/software/>) angewendet.

2.8.8.2 Extrapolation

Mit Hilfe der Software DOTUR (180) wurden für den ermittelten, distanzbasierten Richtwert (3.5.1) die in einer Genbibliothek vertretenen, unterschiedlichen OTUs auf Artenebene abgeschätzt. Unter anderem wurden der nicht-parametrische Schätzwert Chao 1 für den Artenreichtum einer Genbibliothek (Gleichung 8) sowie die beiden Diversitätsindizes Shannon-Weaver (Gleichung 9) und Evenness (Gleichung 10) berechnet. Die „Coverage“ einer Genbibliothek ist ein Maß für den Anteil der beobachteten OTUs an der abgeschätzten Gesamtzahl an OTUs (Gleichung 11).

Gleichung 8: Schätzparameter Chao1

$$Chao1 = N + \frac{n_1(n_1 - 1)}{2(n_2 + 1)}$$

N, Anzahl der in der Genbibliothek aufgetretenen OTUs; n_1 , Anzahl der OTUs mit nur einer Sequenz; n_2 , Anzahl der OTUs mit nur zwei Sequenzen; (35)

Gleichung 9: Shannon-Weaver-Diversitätsindex

$$H' = - \sum_{i=1}^S \frac{S_i}{N} \ln \frac{S_i}{N}$$

S, Anzahl der erhaltenen OTUs; S_i , Sequenzen innerhalb einer OTU; N, Gesamtzahl der Sequenzen in der Genbibliothek; (138)

Gleichung 10: Diversitätsindex Evenness

$$J' = \frac{H'}{\ln S}$$

H' , Shannon-Weaver-Index; S, Gesamtzahl der OTUs; (138)

Gleichung 11: „Coverage“ einer Genbibliothek

$$C = 1 - \frac{n}{N} \times 100$$

n, Anzahl der OTUs mit nur einer Klonsequenz; N, Gesamtzahl der untersuchten Klone; (181)

2.8.8.3 Quantitativer Genbibliothek-Vergleich

Der quantitative Vergleich der *pmoA*-Genbibliotheken erfolgte mit Hilfe des Programms J-Libshuff (179, 181), das eine erweiterte Version des Programms Libshuff darstellt (188). Durch ein statistisches Verfahren ergibt sich, ob zwei Genbibliotheken signifikant unterschiedlich oder gleich sind.

2.8.9 Weitere statistische Verfahren

2.8.9.1 Mittelwert, Standardabweichung, Median und Perzentile

Mittelwerte (\bar{x}), Standardabweichungen (s) und Mediane (\tilde{x}) wurden nach untenstehenden Formeln (165) in Excel 2002 (Microsoft, Redmond, WA, USA) berechnet, wobei n die Anzahl der Werte darstellt und der Laufindex i von 1 bis n läuft. Auch die Berechnung der 10. und 90. Perzentilen erfolgte in Excel 2002.

Gleichung 12: Mittelwert

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i$$

Gleichung 13: Standardabweichung

$$s = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}$$

Gleichung 14: Median

$$\tilde{x} = x_{\frac{n+1}{2}} \quad \text{Falls } n \text{ ungerade}$$

$$\tilde{x} = \frac{1}{2} \left(x_{\frac{n}{2}} + x_{\frac{n}{2}+1} \right) \quad \text{Fall } n \text{ gerade}$$

Die Stichprobengröße muss hierzu geordnet vorliegen, d.h. $x_1 \leq x_2 \leq \dots \leq x_n$.

2.8.9.2 Fehlerfortpflanzung

Die Methode der Fehlerfortpflanzung wurde bei der qPCR zur Berechnung der Genkopienzahlen in den Bodenkernen verwendet. Da für jeden Bodenkern DNA-Extrakte in Triplikaten vorlagen, wurden zunächst diese drei Werte gemittelt und anschließend die Werte der fünf Bodenkern pro Standort gemittelt. Für den Fehler (s_y) bei Summen $y = x_1 + x_2$ gilt Gleichung 15 (165). Da die Anzahl der Werte n eine nicht-fehlerbehaftete Größe darstellt, wird anschließend durch n geteilt

Gleichung 15: Fehlerfortpflanzung bei Summen und Differenzen

$$s_y = \sqrt{(s_{x_1})^2 + (s_{x_2})^2}$$

2.8.9.3 Regression

Zur Berechnung von linearen Regressionen sowie den zugehörigen Korrelationskoeffizienten (R^2) wurde das Programm Excel 2002 (Microsoft, Redmond, WA, USA) verwendet. Nicht-lineare Regressionen (Hyperbeln) wurden mit SigmaPlot Version 10.0 berechnet (Systat Software, Erkrath, Deutschland).

2.8.9.4 Signifikanztest

Die Signifikanz der Übereinstimmung zweier Proben wurde mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Tests (MWU-Test) überprüft (139, 216). Hierzu wurde das Programm STATISTICA (StatSoft, Hamburg, Deutschland) verwendet. Der MWU-Test ist ein nicht-parametrischer Test zum Vergleich von zwei unabhängigen Stichproben, der auch bei geringem Stichprobenumfang Anwendung findet.

3 ERGEBNISSE

3.1 Bodencharakteristika

Die Bestimmung der Feinkörnigkeit des Buchen- und Fichtenwaldbodens im Steigerwald ergab einen hohen Sandanteil (Buche, 70%; Fichte, 58%). 16% bzw. 24% des Bodens waren Schluff und 14% bzw. 18% waren Ton. Damit werden die Böden beider Waldtypen als sandiger Lehm klassifiziert. Die Bodentextur wirkt sich auf den volumetrischen Wassergehalt eines Standorts aus. Im Steigerwald betrug der volumetrische Wassergehalt zum Zeitpunkt der Probennahme 35% im Buchen- und 30% im Fichtenwaldboden. Der hohe Sandanteil am Standort Unterlüß (74-77%) (28) verringert die Wasserhaltekapazität dieser Böden. Der volumetrische Wassergehalt lag hier für beide Waldbodentypen nur bei 29%. Für den Solling liegen keine Werte für die Probennahme vom 5. Mai 2007 vor.

3.2 Einfluss der Baumart auf die Methanoxidation

Anhand von Feldmessungen der atmosphärischen Methanoxidation (Steigerwald), Messungen an intakten Bodenkernen und an Bodenproben verschiedener Bodentiefen wurde der Einfluss der Baumart auf die atmosphärische Methanoxidation sowie das Methanoxidationspotenzial der Buchen- und Fichtenwaldböden verglichen. Da die Bodenkernkerne vom Solling im Verlauf der Methodenoptimierung der Mikrokosmenanlage ihre methanotrophe Aktivität verloren (2.5.2.2.2), liegen sämtliche Daten, die mit der Mikrokosmenanlage erzeugt wurden, nur für die Standorte Steigerwald und Unterlüß vor. Da die Methanaufnahme der Flächenreplikate eines Standorts nicht normal verteilt war, sind sämtliche Aktivitätsdaten als Median mit 10. und 90. Perzentile (im Text in Klammern dargestellt) angegeben.

3.2.1 *In situ* Methanoxidation

Die *in situ* Methanoxidationsrate des Buchen- und Fichtenwaldbodens im Steigerwald wurde am 24. August 2007 mit Hilfe der Haubenmethode untersucht. Der Luftdruck während der Messung lag konstant bei 971 mbar. Die Bodentemperatur im Fichtenbestand betrug 16,5°C. Im anschließend vermessenen, lichtereren Buchenbestand lag die Bodentemperatur etwas höher bei 20,2°C. Die *in situ* Methanoxidationsrate des Fichtenwaldbodens war im Vergleich zu der des

Buchenwaldbodens erniedrigt. Die Aktivitätsunterschiede waren jedoch nicht signifikant, da die Methanoxidationsrate in beiden Waldbeständen einer großen Flächenvariabilität unterlag.

Buche: $110 \mu\text{g CH}_4 \text{ m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ ($49 \mu\text{g CH}_4 \text{ m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ / $141 \mu\text{g CH}_4 \text{ m}^{-2} \text{ h}^{-1}$)

Fichte: $82 \mu\text{g CH}_4 \text{ m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ ($53 \mu\text{g CH}_4 \text{ m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ / $144 \mu\text{g CH}_4 \text{ m}^{-2} \text{ h}^{-1}$)

3.2.2 Methanoxidation intakter Bodenkerne

3.2.2.1 Atmosphärische Methanoxidation

Die Bestimmung der Oxidationsrate atmosphärischen Methans (1,8 ppm Methan, 15°C Inkubationstemperatur, -65 kPa Matrixpotenzial) ergab ähnliche Werte für Steigerwald und Unterlüß. Auch die Unterschiede zwischen Buchen- und Fichtenwaldböden der beiden Standorte fielen gering aus und waren nicht signifikant.

Steigerwald Buche: $35 \mu\text{g CH}_4 \text{ m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ ($32 \mu\text{g CH}_4 \text{ m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ / $41 \mu\text{g CH}_4 \text{ m}^{-2} \text{ h}^{-1}$)

Steigerwald Fichte: $34 \mu\text{g CH}_4 \text{ m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ ($28 \mu\text{g CH}_4 \text{ m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ / $45 \mu\text{g CH}_4 \text{ m}^{-2} \text{ h}^{-1}$)

Unterlüß Buche: $34 \mu\text{g CH}_4 \text{ m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ ($30 \mu\text{g CH}_4 \text{ m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ / $41 \mu\text{g CH}_4 \text{ m}^{-2} \text{ h}^{-1}$)

Unterlüß Fichte: $29 \mu\text{g CH}_4 \text{ m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ ($27 \mu\text{g CH}_4 \text{ m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ / $44 \mu\text{g CH}_4 \text{ m}^{-2} \text{ h}^{-1}$)

3.2.2.2 Michaelis-Menten-Kinetiken

Mit zunehmender Methankonzentration (maximal 100 ppm bzw. $50 \mu\text{g m}^{-2}$) zeigten sich deutliche Unterschiede in den Methanoxidationsraten der Buchen- und Fichtenwaldböden von Steigerwald und Unterlüß (Abbildung 7). Die Michaelis-Menten-Parameter $V_{\text{max(app)}}$ und $K_{\text{M(app)}}$ waren in Buchenwaldböden zwei- bis fast dreimal so hoch wie in den jeweiligen Fichtenwaldböden (Tabelle 18). Insgesamt zeigten die Böden des Standorts Unterlüß ein größeres Methanoxidationspotenzial als die Böden des Standorts Steigerwald (Abbildung 7).

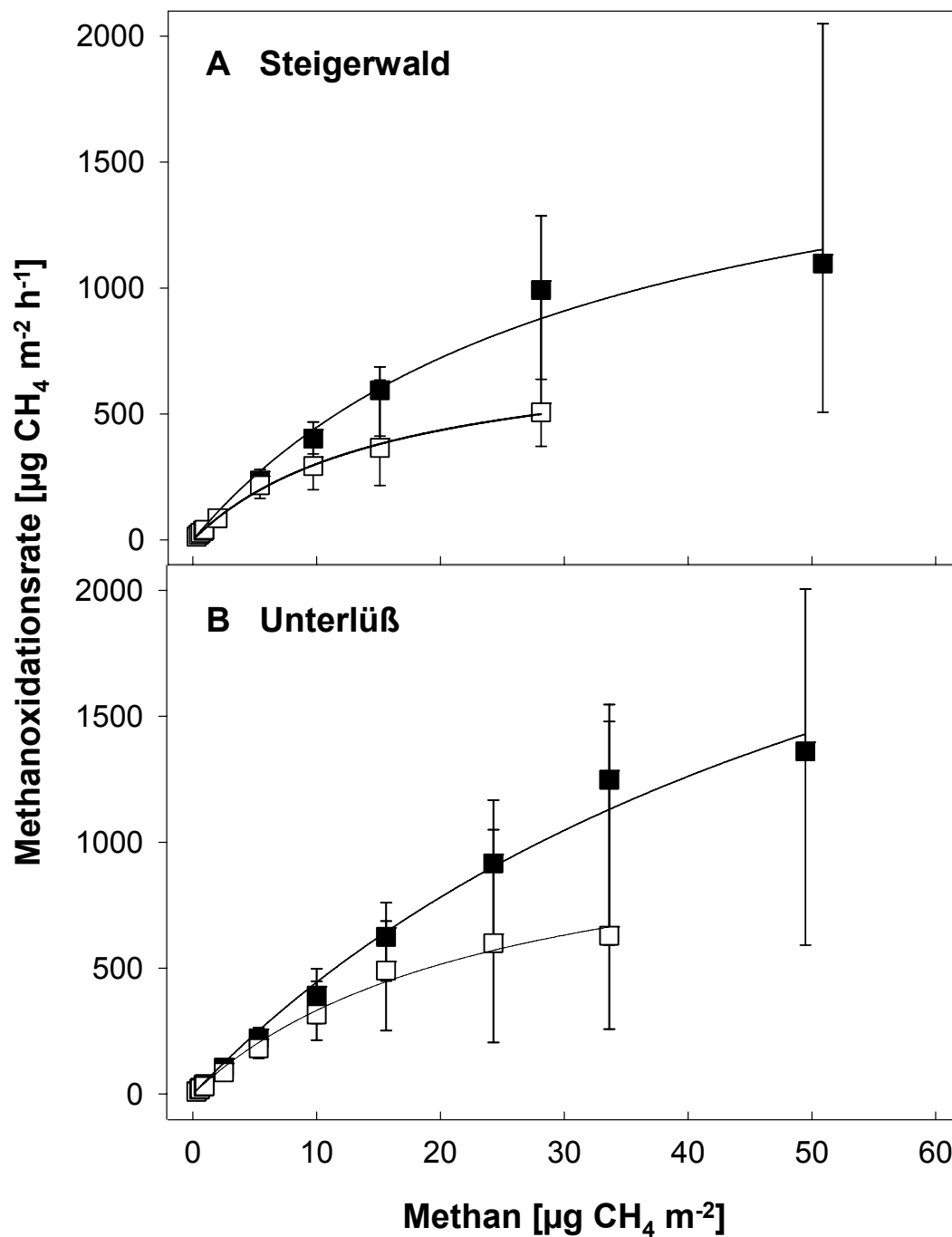


Abbildung 7: Michaelis-Menten-Kinetiken der Methanoxidation der Buchen- und Fichtenbodenkerne von Steigerwald und Unterlöß. Schwarz, Buche; weiß, Fichte; dargestellt sind Mediane ($n=10$) mit 10. und 90. Perzentile. Die x-Achse repräsentiert die Eingangsmethankonzentration in den Mikrokosmen. Das Bestimmtheitsmaß R^2 der hyperbolischen Regressionskurven war stets größer als 0,991. Aus technischen Gründen konnte in Fichtenböden die Methanoxidationsrate für die höchste Methankonzentration nicht bestimmt werden.

Tabelle 18: Parameter der Michaelis-Menten-Kinetiken der Methanoxidation der Buchen- und Fichtenwaldbodenkerne von Steigerwald und Unterlüß.

Standort	Baumart	$V_{\max(\text{app})}$ [$\mu\text{g CH}_4 \text{ m}^{-2} \text{ h}^{-1}$] ^a	$K_{\text{M}(\text{app})}$ [$\mu\text{g CH}_4 \text{ m}^{-2}$] ^a
Steigerwald	Buche	1881 ± 196	32 ± 6
	Fichte	782 ± 35	16 ± 1
Unterlüß	Buche	3268 ± 491	64 ± 14
	Fichte	1148 ± 120	25 ± 5

^a Vermessen wurden jeweils zehn Bodenkerne bei 13 verschiedenen Methankonzentrationen im Bereich von 0,3 bis 100 ppm Methan

3.2.3 Vertikale Verteilung der atmosphärischen Methanoxidation

Die atmosphärische Methanoxidationsrate (bei 1,8 ppm Methan) war, mit Ausnahme des Mineralbodens vom Solling, in Bodenhorizonten unter Buche höher als unter Fichte (Abbildung 8). Die höchste methanotrophe Aktivität in beiden Waldtypen von Steigerwald und Unterlüß und im Fichtenwaldboden vom Solling fand sich im oberen Mineralboden (0-5 cm) und nahm mit zunehmender Bodentiefe ab. Im Buchenwaldboden vom Solling war die höchste Aktivität im O_a -Horizont lokalisiert. Auch im Buchenwaldboden des Standorts Unterlüß zeigte der O_a -Horizont methanotrophe Aktivität. Im Steigerwald war unter Buche kein O_a -Horizont ausgebildet. Der O_a -Horizont in Buchenwaldböden war der einzige organische Horizont mit Fähigkeit zur Oxidation atmosphärischen Methans. Weder der O_a -Horizont unter Fichte noch der O_f -+ O_e -Horizont in beiden Waldtypen zeigten methanotrophe Aktivität. Methanproduktion bei Anoxia wurde nur gelegentlich detektiert, betrug maximal 0,4 ng $\text{CH}_4 \text{ g}_{\text{TG}} \text{ h}^{-1}$ und wurde deshalb vernachlässigt.

3.2.4 Einfluss der Baumwurzeln auf die Methanoxidation

Die Analyse der Methanoxidation von Wurzeln, Rhizosphäre und nicht durchwurzelter Boden vom Buchen- und Fichtenbestand des Steigerwalds sollte klären, ob sich die Präsenz von Baumwurzeln auf die Aktivität atmosphärischer Methanoxidierer auswirkt. Bei beiden Probennahmen (November 2008 und August 2009) waren die atmosphärischen Methanoxidationsraten im Fichtenbestand generell niedriger als im Buchenbestand (Abbildung 9). Die atmosphärische Methanaufnahme der Rhizosphäre unterschied sich nicht signifikant von der des undurchwurzelter Bodens.

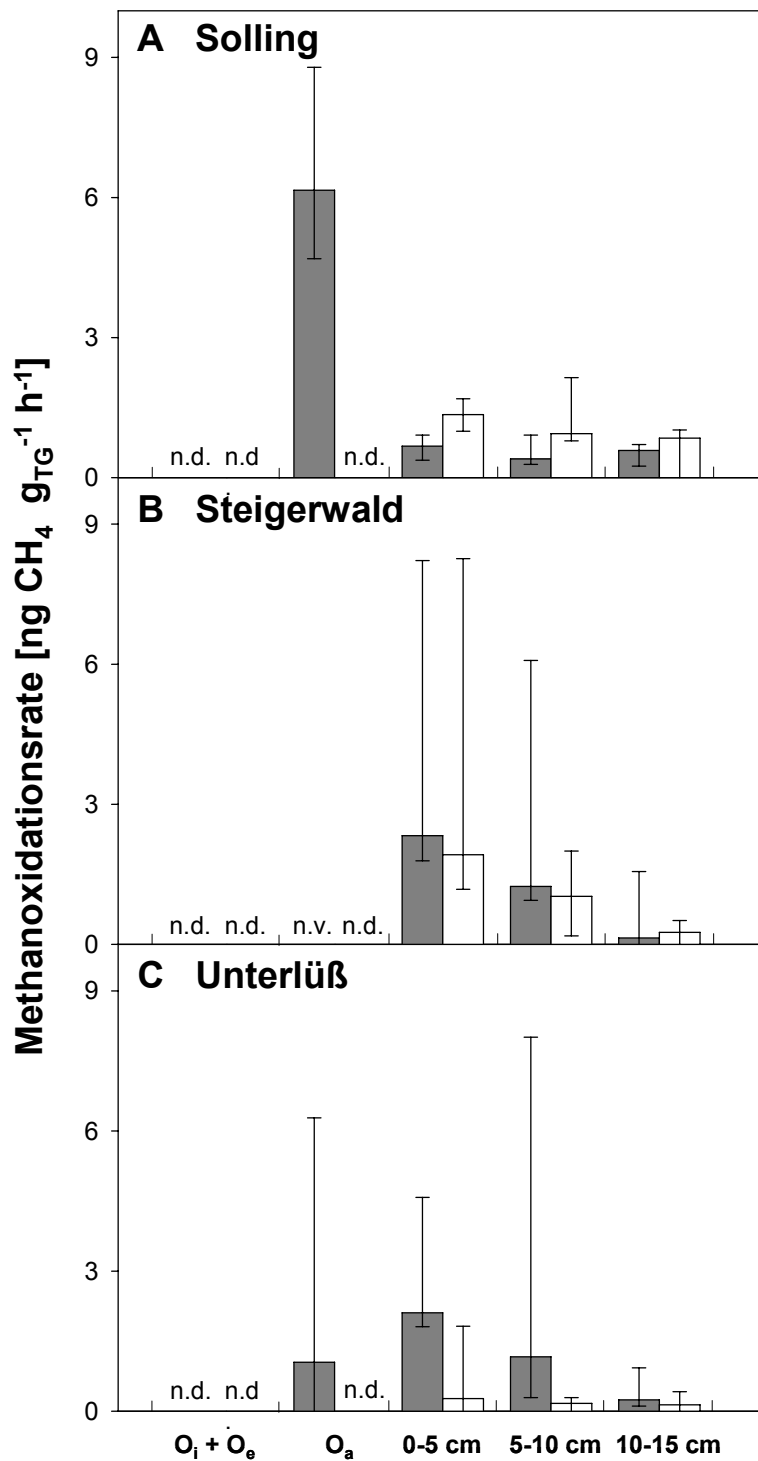


Abbildung 8: Vertikale Verteilung der Methanoxidationsraten in Buchen- und Fichtenwaldböden von Solling, Steigerwald und Unterlüß. Grau, Buche; weiß, Fichte; dargestellt sind Mediane (n=5) mit 10. und 90. Perzentile. Proben vom O_i - und O_e -Horizont wurden gemischt. n.d., keine Methanoxidation detektierbar; n.v., Horizont nicht vorhanden.

Die Ergebnisse der ersten Probennahme deuten zwar auf einen positiven Effekt der Buchenwurzeln auf die atmosphärische Methanoxidation in der Rhizosphäre hin (Abbildung 9A); dieser Effekt konnte jedoch durch die zweite Probennahme nicht bestätigt werden (Abbildung 9B). Aus diesem Grund wurde auf die geplante Analyse der Monoterpenkonzentration in Rhizosphäre und Mineralboden des Fichtenbestandes verzichtet. Bei der Inkubation von Buchen- und Fichtenwurzeln wurde weder Methanbildung noch -oxidation verzeichnet. Damit ist auszuschließen, (i) dass Buchen- und Fichtenwurzeln Methan emittieren oder oxidieren und (ii) dass atmosphärische Methanoxidierer direkt mit Baumwurzeln assoziiert sind.

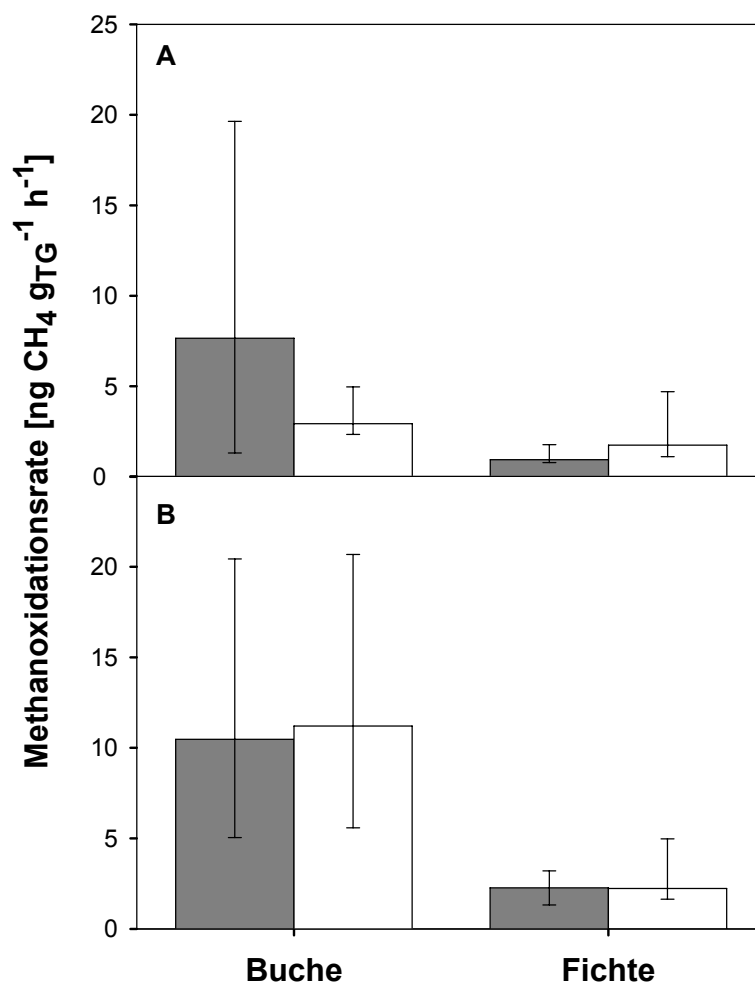


Abbildung 9: Methanoxidationsrate in Rhizosphäre und nicht durchwurzeltem Boden des Buchen- und Fichtenbestands vom Steigerwald. (A) Probennahme vom 3.11.2008, n=5, (B) Probennahme vom 25.08.2009, n=10; grau, Rhizosphäre; weiß, nicht durchwurzelter Boden; dargestellt ist jeweils der Median der fünf bzw. zehn Flächenreplikate mit 10. und 90. Perzentile. Verwendet wurden Bodenproben, die sich zu gleichen Anteilen aus O_a-Horizont und 0-5 cm Mineralboden zusammensetzten.

3.3 Vergleichende Analyse von Umweltfaktoren

3.3.1 Organische Auflage

In Bezug auf die Mächtigkeit der organischen Auflage unterschieden sich Buchen- und Fichtenkerne nicht (zwischen 4 und 7 cm). Vielmehr herrschte eine hohe Flächenvariabilität innerhalb der einzelnen Bestände. Bei Entfernung der organischen Auflage stieg die atmosphärische Methanoxidationsrate der behandelten Bodenkerne im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollbodenkernen leicht an (maximal 3%, Tabelle 19). Der Effekt fiel in Buchen- und Fichtenwaldbodenkernen ähnlich stark aus.

Tabelle 19: Effekt der Entfernung der organischen Auflage auf die atmosphärische Methanoxidation in Buchen- und Fichtenwaldböden von Steigerwald und Unterlüß.

Standort	Baumart	Behandlung	Methanoxidationsrate [$\mu\text{g CH}_4 \text{ m}^{-2} \text{ h}^{-1}$] ^c	
			Vorher	Nachher
Steigerwald ^a	Buche	- ^d	34.6 (30.7, 40.2)	34.4 (30.0, 39.7)
		O _i , O _e entfernt	35.8 (32.0, 40.5)	38.4 (35.2, 43.0)
	Fichte	- ^d	33.0 (29.8, 44.5)	33.7 (30.6, 44.1)
		O _i , O _e , O _a entfernt	35.3 (28.3, 37.2)	37.3 (30.4, 39.0)
Unterlüß ^b	Buche	- ^d	34.1 (24.4, 40.7)	34.0 (24.8, 40.4)
		O _i , O _e entfernt	34.1 (29.9, 41.1)	36.9 (30.8, 44.4)
	Fichte	- ^d	25.9 (25.0, 31.1)	26.1 (22.0, 31.8)
		O _i , O _e entfernt	28.9 (26.7, 43.7)	29.1 (28.1, 40.9)

^a Der O_a-Horizont im Buchenwaldboden war nicht ausgebildet. Aus diesem Grund wurde der O_a-Horizont im Fichtenwaldboden ebenfalls entfernt.

^b Da im O_a-Horizont des Buchenwaldbodens atmosphärisches Methan oxidiert wurde (Abbildung 8), wurden für beide Waldtypen nur der O_i-und O_e-Horizont entfernt.

^c Messungen der Methanoxidationsrate wurden vor und 24 h nach der Behandlung durchgeführt. Dargestellt sind Mediane (n=5) mit 10. und 90. Perzentile.

^d Von diesen Bodenkernen wurden die organischen Horizonte nicht entfernt (Kontrollbodenkerne).

3.3.2 pH-Wert

Der pH-Wert der Bodenproben wurde sowohl in wässrigen Extrakten als auch in CaCl_2 -Lösung gemessen (Tabelle 20). Der pH-Wert in Wasser gibt den tatsächlich im Boden vorliegenden pH-Wert wieder. Bei Verwendung von CaCl_2 werden auch die in aciden Verbindungen, z.B. Huminstoffen, gebundenen Protonen ausgetauscht, was den pH-Wert gegenüber dem in Wasser erniedrigt.

Tabelle 20: pH-Wert verschiedener Horizonte der Buchen- und Fichtenwaldböden von Solling, Steigerwald und Unterlüß, gemessen in wässrigen und salzhaltigen Extrakten

Standort	Baumart	pH-Wert				
		O _i +O _e	O _a	0–5 cm	5–10 cm	10–15 cm
H ₂ O						
Solling	Buche	4.1	4.4	4.1	4.1	4.3
	Fichte	4.8	5.4	4.8	4.8	4.7
Steigerwald	Buche	4.9	n.v.	4.4	4.5	4.6
	Fichte	4.4	4.0	4.0	4.2	4.4
Unterlüß	Buche	5.0	4.2	4.3	4.4	4.6
	Fichte	4.3	3.9	4.0	4.1	4.1
CaCl ₂						
Solling	Buche	3,0	2,9	3,2	3,4	3,7
	Fichte	4,5	4,7	4,0	3,8	3,8
Steigerwald	Buche	3,9	n.v.	3,3	3,5	3,7
	Fichte	3,4	3,1	3,3	3,7	3,9
Unterlüß	Buche	3,9	3,0	3,2	3,6	3,9
	Fichte	3,6	3,1	3,2	3,3	3,5

Ein Vergleich der pH-Werte zeigt, dass alle Waldböden sauer sind, mit pH-Werten zwischen 3,9 und 5,4 (H_2O) bzw. 2,9 und 4,7 (CaCl_2). Mit Ausnahme des Sollings waren die pH-Werte in Böden unter Fichte geringfügig niedriger. Die Unterschiede waren jedoch mit im Mittel 0,3 pH-Einheiten gering und können vernachlässigt werden. Im Solling ist der Buchenwaldboden saurer

als der Fichtenwaldboden, da Letzterer etwa 25 Jahre zuvor gekalkt worden war (etwa 30 t ha⁻¹, persönliche Kommunikation: Werner Borken). Die sauersten Bodenhorizonte der Standorte Steigerwald und Unterlüß waren der O_a-Horizont und der obere Mineralboden, die Bodenhorizonte, die die höchste methanotrophe Aktivität aufwiesen (Abbildung 8).

3.3.3 Ammoniumkonzentration

Die höchste Ammoniumkonzentration in den Waldböden lag mit maximal 144 µg g_{TG}⁻¹ im O_i+O_e-Horizont vor (Tabelle 21). Mit zunehmender Bodentiefe nahm die Ammoniumkonzentration stark ab, so dass in den untersten Mineralbodenschichten nur noch maximal 1,1 µg g_{TG}⁻¹ detektiert wurden. In den meisten Fällen war die Konzentration von Ammonium in Buchen- und Fichtenwaldproben ähnlich oder höher unter Buche (siehe Steigerwald). Der O_a-Horizont vom Solling bildet hierbei eine Ausnahme. Die Ammoniumkonzentration war hier unter Fichte 13 Mal höher als in der entsprechenden Buchenprobe.

Tabelle 21: Ammoniumkonzentration verschiedener Horizonte der Buchen- und Fichtenwaldböden von Solling, Steigerwald und Unterlüß

Standort	Baumart	Ammonium [µg g _{TG} ⁻¹] ^a				
		O _i + O _e	O _a	0–5 cm	5–10 cm	10–15 cm
Solling	Buche	44.3	2.7	0.3	0.3	0.2
	Fichte	57.2	35.1	0.4	<0.1	<0.1
Steigerwald	Buche	96.9	n.v. ^b	5.1	1.3	1.1
	Fichte	72.5	7.9	0.8	0.2	0.1
Unterlüß	Buche	144.1	8.4	0.9	0.7	0.4
	Fichte	66.0	12.3	0.9	0.3	0.3

^a Für die Analyse wurden jeweils fünf Raumreplikate gemischt und wässrige Extrakte hergestellt. Die ermittelten Werte stellen somit die biologisch verfügbare Ammoniumkonzentration dar.

^b Horizont nicht vorhanden

3.3.4 Ethylenproduktion

Nur in zwei von fünf Flächenreplikaten des O_i+O_e -Horizonts vom Fichtenwaldboden im Solling und in einem Fichtenreplikat dieses Horizonts vom Standort Unterlüß wurde nach 72 Stunden eine geringe Ethylenakkumulation von maximal $45 \text{ ng C}_2\text{H}_4 \text{ g}_{\text{TG}}^{-1}$ detektiert. Unter Buche wurde in keiner einzigen Probe die Bildung und Akkumulation von Ethylen beobachtet. Die Ethylenproduktion der untersuchten Waldbodenproben unter oxischen Bedingungen war somit zu vernachlässigen.

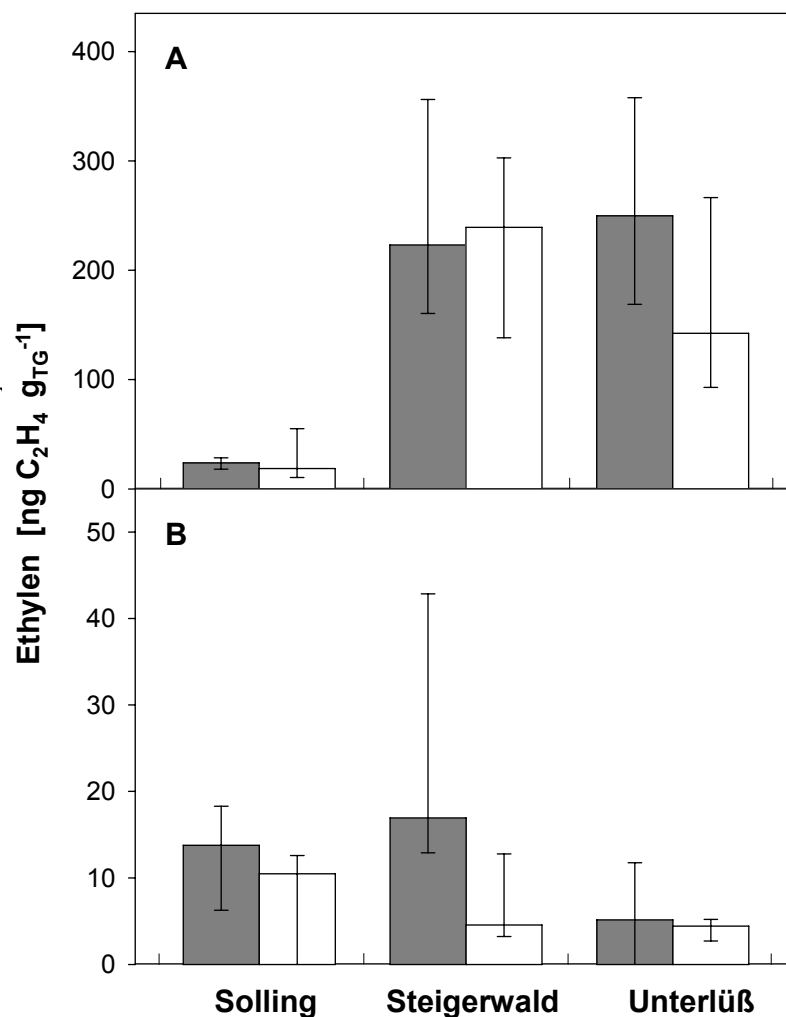


Abbildung 10: Ethylenkonzentration nach 72 h Anoxia in verschiedenen Horizonten der Buchen- und Fichtenwaldböden von Solling, Steigerwald und Unterlüß. (A) $O_i + O_e$ -Horizont, gemischt; (B) Bodenhorizont mit den größten Unterschieden in den atmosphärischen Methanoxidationsraten zwischen Buche und Fichte (Solling: O_a -Horizont; Steigerwald und Unterlüß: 0-5 cm Mineralboden). Grau, Buche; weiß, Fichte; dargestellt sind Mediane ($n=5$) mit 10. und 90. Perzentile.

Unter anoxischen Bedingungen fand jedoch eine deutliche Akkumulation von Ethylen statt, vorwiegend im O_i - und O_e -Horizont lokalisiert. Hier wurden nach 72 Stunden in einzelnen Proben bis zu $358 \text{ ng C}_2\text{H}_4 \text{ g}_{\text{TG}}^{-1}$ gebildet (Abbildung 10A). Während die Ethylenbildung in Buchen- und Fichtenwaldböden von Solling und Steigerwald vergleichbar war, wurde in Buchenwaldböden vom Standort Unterlüß deutlich mehr Ethylen gebildet als in Böden unter Fichte. Mit zunehmender Bodentiefe nahm die Ethylenproduktion stark ab. Im Solling konnte unterhalb der organischen Auflage keine Ethylenproduktion mehr verzeichnet werden. Im Fichtenwaldboden vom Steigerwald war unterhalb des 0-5 cm Mineralbodens keine Ethylenbildung mehr detektierbar, während unter Buche sowie in beiden Bodentypen vom Standort Unterlüß auch noch in den untersten Bodenhorizonten 2 bis $4 \text{ ng C}_2\text{H}_4 \text{ g}_{\text{TG}}^{-1}$ akkumulierten. In den Bodenhorizonten, die die größten Unterschiede in den atmosphärischen Methanoxideraten aufwiesen (Solling: O_a -Horizont, Steigerwald und Unterlüß, 0-5 cm Mineralboden, Abbildung 8) war die Ethylenproduktion in Buchen- und Fichtenwaldproben vergleichbar oder, im Fall des Steigerwalds, höher unter Buche (Abbildung 10B).

3.4 Einfluss von β -Pinen auf die Expression der pMMO

Ziel dieses Experiments war es, durch die Zugabe einer hohen Konzentration von Methan eine Induktion der pMMO-Expression herbeizuführen und diese über die Transkription der RNA in cDNA (2.8.1.3) und anschließende Quantifizierung der Transkripte mittels des qPCR-Assays Q-USC α (2.8.3.2) zu messen. Im Gegensatz dazu sollte die Induktion der pMMO-Expression in Bodenaufschlämmungen mit β -Pinen durch das Monoterpen vermindert oder gar verhindert werden.

Die Zugabe von 0,1 bzw. 2,2 μmol β -Pinen zu oxischen Bodenaufschlämmungen vom Buchenbestand im Steigerwald bewirkte, unabhängig von der Methankonzentration in der Atmosphäre der Mikrokosmen, eine vollständige Inhibierung der Methanoxidation. In Bodenaufschlämmungen ohne β -Pinen wurden dagegen 100 ppm Methan innerhalb von 30 bis 51 Stunden komplett verbraucht (Abbildung 11). Bei 1% Methan in der Atmosphäre der Mikrokosmen fand innerhalb von 51 Stunden, auch in Abwesenheit von β -Pinen, keine Abnahme der Methankonzentration statt (nicht dargestellt). Methanbildung unter anoxischen Bedingungen (Kontrolle mit Argon als Atmosphäre) wurde ebenfalls nicht beobachtet.

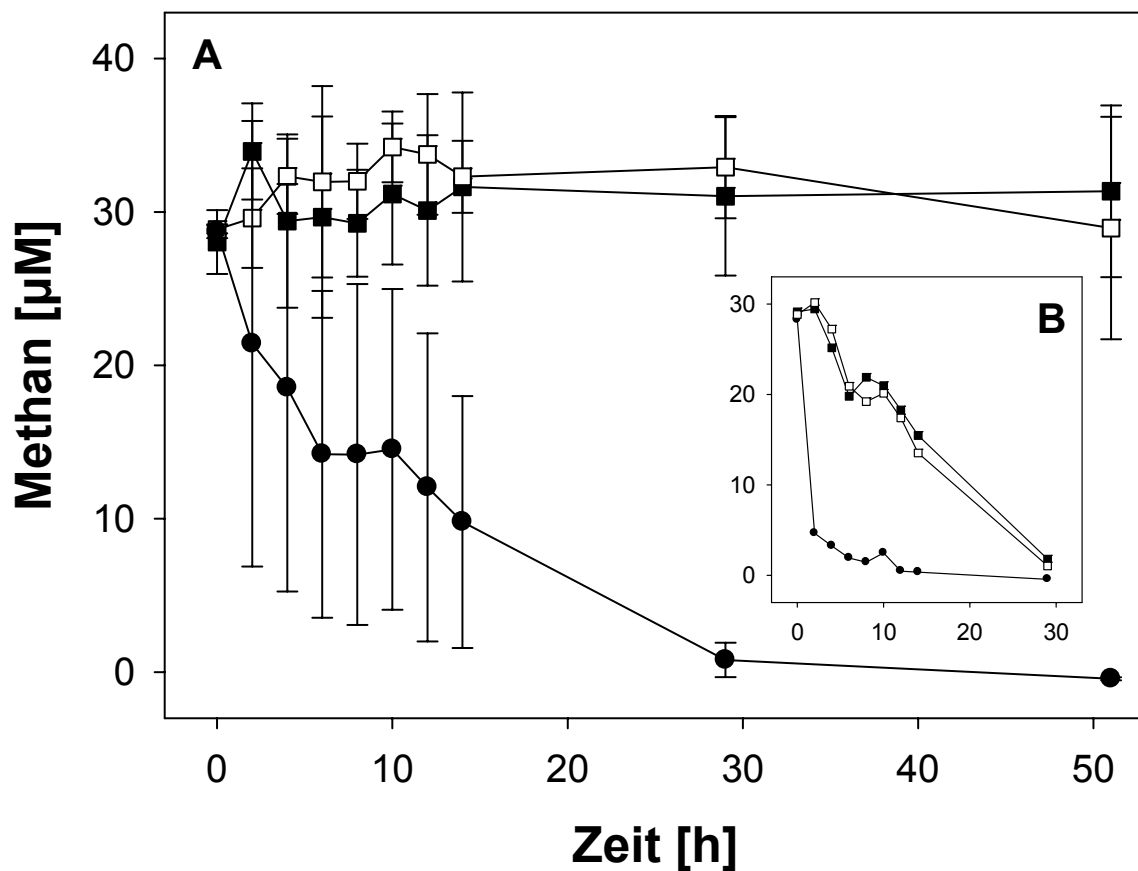


Abbildung 11: Einfluss von β -Pinen auf die Oxidation von 100 ppm Methan in Bodenaufschlämmungen des Buchenbestandes vom Steigerwald. (A) ■, Zugabe von 2,2 μmol β -Pinen; □, Zugabe von 0,1 μmol β -Pinen; ●, ohne Zugabe von β -Pinen; dargestellt sind Mittelwerte aus drei Replikaten mit Standardabweichung; (B) Einzelreplikate (Replikat 1-3) ohne Zugabe von β -Pinen

Anschließend wurde von den bei -80°C gelagerten Flüssigproben der Ansätze bei 100 ppm Methan ohne β -Pinen-Zugabe RNA extrahiert. Die Inhibitions-Kontroll-RNA (2.8.1.4) wurde den RNA-Extrakten vor der Reversen Transkription (2.8.1.3) zugeführt. So konnten die gemessenen Transkriptzahlen um die Effizienz der RT-Reaktion korrigiert werden. Die Quantifizierung der *pmoA*-Transkripte war jedoch mit keinem der verwendeten RNA-Extraktionsprotokolle (2.8.1.2) erfolgreich. Bei der Extraktion mit Hilfe des RNA PowerSoil Total RNA Isolation Kit (MO BIO Laboratories, Carlsbad, CA, USA) war die qPCR so stark inhibiert, dass eine Quantifizierung der geringen Transkriptmengen nicht möglich war. Bei der Griffith-Extraktion mit anschließender Trennung von RNA und DNA mit dem Allprep Mini Kit mussten die RNA-Extrakte zunächst einem DNase-Verdau unterzogen werden, um Kontaminationen mit DNA zu beseitigen (2.8.1.5). Doch

auch nach der Aufreinigung konnten keine *pmoA*-Transkripte mittels qPCR detektiert werden. Die Trennung von DNA und RNA mit dem DNA/RNA Mini Kit nach der Griffith-Extraktion schien Huminsäuren zuverlässiger zu entfernen und zeigte keine Kontamination der RNA mit DNA. Die Inhibition während der qPCR war relativ gering. Es traten jedoch unspezifische Nebenbanden auf, die auch nach Modifikation des Temperaturprogramms von Assay Q-USCα nicht beseitigt werden konnten. Aufgrund methodischer Probleme konnte somit nicht geklärt werden, ob Monoterpene die Expression der pMMO beeinflussen.

3.5 Zusammensetzung der methanotrophen Gemeinschaft

Die methanotrophe Diversität und Abundanz in Buchen- und Fichtenwaldböden wurde verglichen, um den Einfluss der Baumart auf die Struktur der methanotrophen Lebensgemeinschaft zu klären. Für die Analysen wurde DNA aus Bodenproben der Horizonte mit der höchsten methanotrophen Aktivität extrahiert (Abbildung 8, Buche: 0,1 g des O_a-Horizonts plus 0,2 g des 0-5 cm Mineralbodens; Fichte: 0,3 g des 0-5 cm Mineralbodens).

3.5.1 Distanzbasierter Richtwert („Cut-off“) zur Differenzierung methanotropher OTUs auf Artenebene

Um Genbibliotheken unterschiedlicher Standorte quantitativ und qualitativ miteinander vergleichen zu können, bedarf es eines definierten Sequenzunterschieds als Richtwert („Cut-off“) zur Unterscheidung verschiedener OTUs. Zur Ermittlung eines solchen „Cut-Offs“ für Methanotrophe in Waldböden wurde die Sequenzähnlichkeit der *pmoA*/PmoA von 22 methanotrophen Reinkulturen mit der Sequenzähnlichkeit ihrer 16S rRNA Gene verglichen. Sowohl auf DNA- als auch auf Proteinebene ergab sich eine lineare Korrelation, die zeigt, dass die Phylogenie von Methanotrophen basierend auf *pmoA* bzw. PmoA gut mit der auf dem 16S rRNA Gen basierenden Phylogenie übereinstimmt (Abbildung 12). Der Schnittpunkt der linearen Regressionsgeraden mit dem 97%-„Cut-off“ zur Differenzierung von Arten basierend auf dem 16S rRNA Gen (193) resultiert in einem auf *pmoA*/PmoA-Sequenzähnlichkeit basierenden „Cut-off“ von 87% bzw. 93% zur Unterscheidung methanotropher OTUs auf Artenebene. Dies entspricht einem distanzbasierten „Cut-off“ von 13% (DNA) bzw. 7% (Protein). Sämtliche Diversitätsanalysen erfolgten auf Proteinebene und die Einteilung von OTUs basierte auf 7% PmoA-Sequenzunterschied. Eine OTU repräsentiert somit eine methanotrophe „Spezies“.

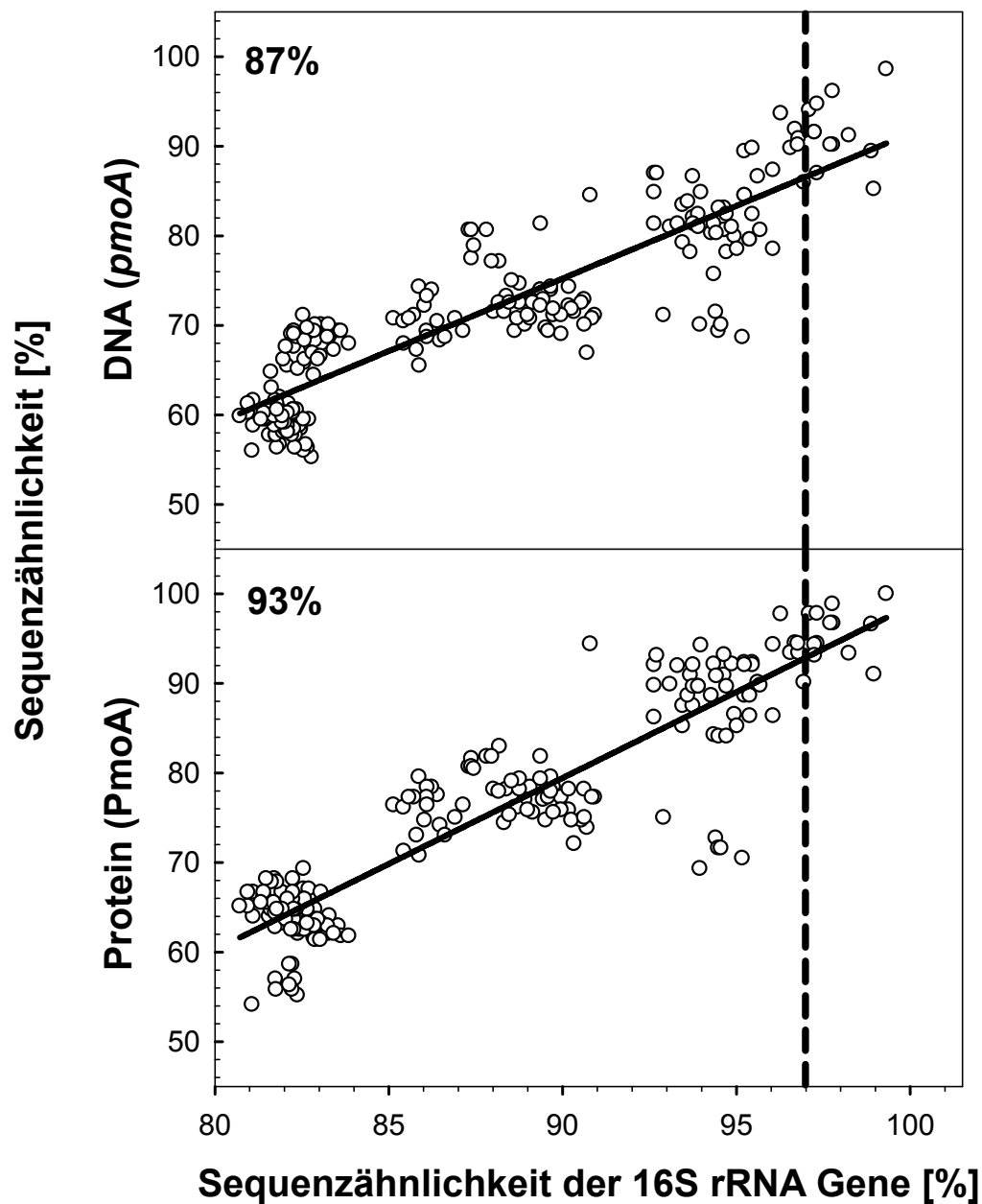


Abbildung 12: Korrelation der Sequenzähnlichkeit von *pmoA* (DNA) und PmoA (Protein) mit der Sequenzähnlichkeit der 16S rRNA Gene von 22 paarweise verglichenen, methanotropen Stämmen. Die gestrichelte Linie zeigt den auf 97%-Sequenzähnlichkeit des 16S rRNA Gens basierenden „Cut-Off“ zur Differenzierung von Arten (193). Der Schnittpunkt der gestrichelten Linie mit der Regressionsgeraden ergibt eine Sequenzähnlichkeit von 87% bzw. 93% für methanotrophe OTUs auf Artenebene basierend auf *pmoA*/PmoA. Das Bestimmtheitsmaß R^2 der linearen Regressionen war 0,85 für die DNA-Analyse und 0,79 für die Proteinanalyse. Die „Accession Numbers“ der analysierten methanotropen Sequenzen sind in Tabelle 17 dargestellt.

3.5.2 Diversität

3.5.2.1 *pmoA*

3.5.2.1.1 Genbibliotheken

Die Amplifikation der *pmoA*-Genfragmente aus hochmolekularer Boden-DNA mit Hilfe des Primerpaars A189f/A682r war bei allen Standorten erfolgreich. Bei einigen Proben traten während der PCR unspezifische Nebenprodukte auf, so dass das Amplikon der richtigen Länge aus dem Agarose-Gel aufgereinigt wurde (2.8.5.1). Die PCR-Produkte der fünf Flächenreplikate pro Standort wurden vereinigt und daraus Genbibliotheken angelegt, um die Diversität der *pmoA*-Gene in Buchen- und Fichtenwaldböden zu vergleichen. Insgesamt enthielten die Genbibliotheken 366 Gensequenzen, 204 aus Buchen- und 162 aus Fichtenwaldböden. 39 Sequenzen, ein hoher Anteil davon aus der Genbibliothek Solling-Fichte (76% der Sequenzen), waren kodetekierte *amoA*-Sequenzen (in Tabelle 22 nicht aufgeführt). Die „Coverage“ der Genbibliotheken für *pmoA* lag, basierend auf dem 7%-„Cut-off“, meist zwischen 93% und 100%. Für die Genbibliothek Solling-Fichte betrug die „Coverage“ aufgrund der geringeren Anzahl an *pmoA*-Sequenzen 82%.

Tabelle 22: *pmoA*-Genbibliotheken

Standort	Baumart	Anzahl <i>pmoA</i> -Sequenzen	„Coverage“ [%]
Solling	Buche	41	93
	Fichte	11	82
Steigerwald	Buche	85	99
	Fichte	76	100
Unterlüß	Buche	75	100
	Fichte	39	100

3.5.2.1.2 Quantitative und qualitative Analyse der Genbibliotheken

Die Abschätzung der Gesamtzahl an OTUs in den Genbibliotheken anhand des nicht-parametrischen Schätzwerts Chao1 lag für die Buchenwaldböden immer höher als für die Fichtenwaldböden (Tabelle 23). Auch die Zahl der OTUs in den Böden der einzelnen Standorte unterschied sich: Solling > Steigerwald > Unterlüß. Der Shannon-Weaver-Diversitätsindex deutet ebenfalls auf eine höhere Diversität von Methanotrophen in Buchenwaldböden und im Solling hin. Die Evenness beschreibt die Verteilung der einzelnen OTUs innerhalb einer Genbibliothek. Hohe

Werte, wie beim Solling, bedeuten, dass die Zahl der Gensequenzen auf die vorhandenen OTUs relativ gleichmäßig verteilt ist.

Tabelle 23: Analyse der *pmoA*-Genfragmente der Methanotrophengemeinschaft verschiedener Waldstandorte

Standort	Chao1	Shannon	Evenness	J-Libshuff p^d
Solling	7 (13 - 4) ^a	1,14	0,59	0,04 / 0,81
Steigerwald	4 (4 - 2) ^a	0,44	0,32	0,00 / 0,28
Unterlüß	3 (3 - 1) ^a	0,52	0,47	0,00 / 1,00
Buche _{S,SW,U} ^b	9	0,88	0,42	n.a. ^e
Fichte _{S,SW,U} ^b	5	0,31	0,22	n.a. ^e
Total ^c	8	0,70	0,34	0,00 / 0,46

^a Der Wert vor der Klammer gibt den Chao1-Wert für Buchen- plus Fichtengensequenzen vom jeweiligen Standort wieder. Die Werte in Klammern repräsentieren die Chao1-Werte, die für die Buchen- bzw. Fichtensequenzen separat ermittelt wurden.

^b Gensequenzen vom Buchen- bzw. Fichtenwaldboden aller drei Standorte zusammengekommen

^c Gensequenzen aller sechs Genbibliotheken

^d Paarweiser Vergleich der Buchen- und Fichtengenbibliotheken. Die Analyse erfolgte separat für jeden Standort. Zusätzlich wurden die Buchen- und Fichtensequenzen aller drei Standorte zusammengefasst und verglichen (Total); Monte-Carlo-Korrektur: p-Wert: 0,03

^e nicht anwendbar

Die Ergebnisse der Rarefaction-Analyse der Genbibliotheken unterstützen die Chao1- und Shannon-Weaver-Indizes. Die Fehlerbereiche der Buchen- und Fichtengenbibliothek überlappen sich nur zu Beginn der Kurven (Abbildung 13A). Die Diversität Methanotropher basierend auf PmoA ist in Buchenwaldböden deutlich erhöht gegenüber Fichtenwaldböden. Auch bei der Rarefaction-Analyse wird klar, dass die Diversität im Solling die der anderen beiden Standorte übertrifft. Die Kurve verläuft deshalb steiler (Abbildung 13B). Steigerwald und Unterlüß ähneln sich dagegen stark in Bezug auf die Diversität methanotropher OTUs. Mit Ausnahme der Kurve vom Solling (geringe Sequenzzahl) flachen alle Kurven bereits ab, ein Zeichen dafür, dass mit hoher Wahrscheinlichkeit alle methanotrophen OTUs erfasst wurden. Schätzt man die Zahl der zu erwartenden OTUs zum Ende der Kurven hin ab, kommt man auf annähernd dieselben Zahlen wie bei der Chao1-basierten Abschätzung.

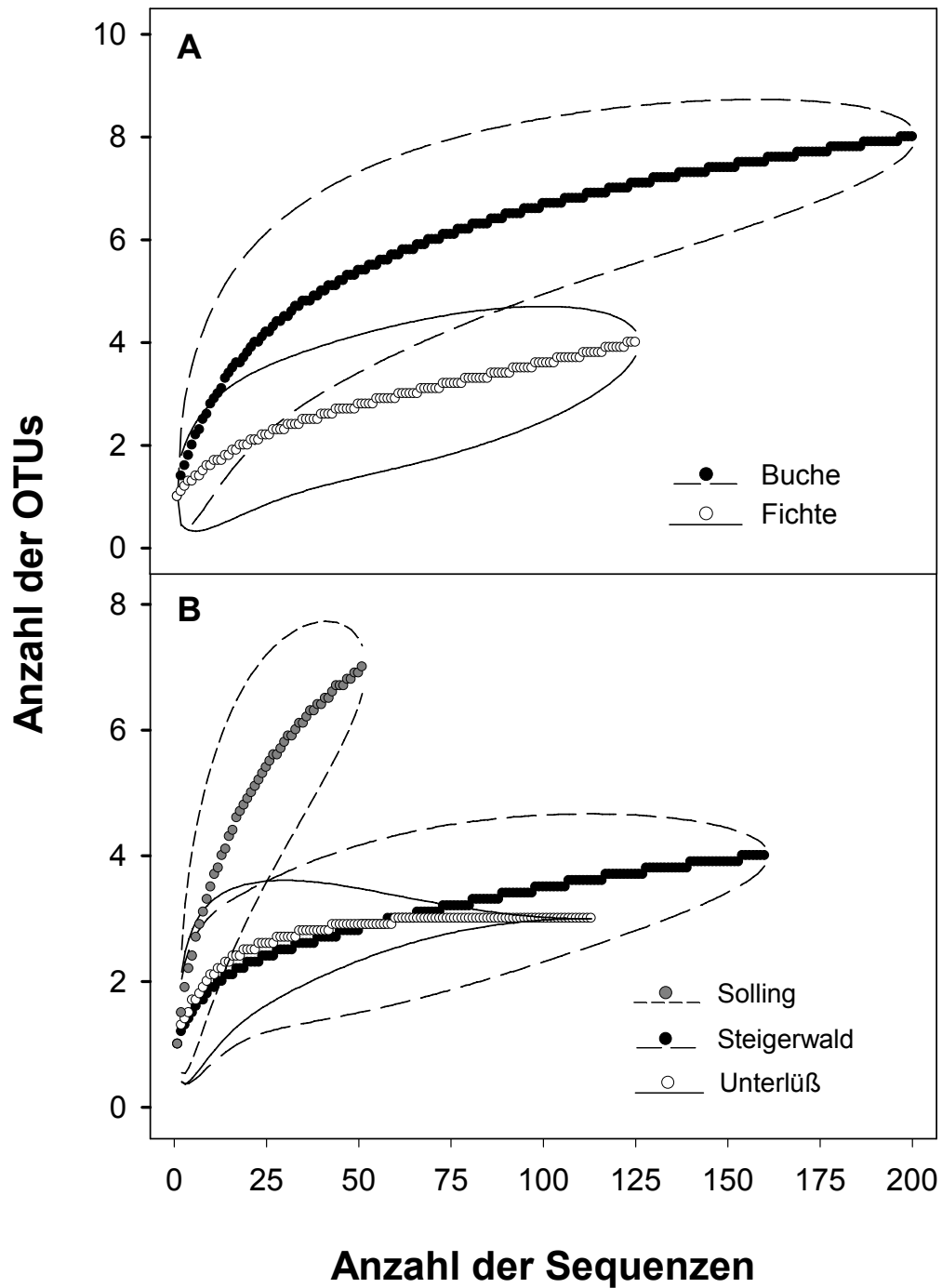


Abbildung 13: Rarefaction-Analyse mit 95%-Konfidenzbereich der verschiedenen OTUs der Gensequenzen der Buchen- und Fichtenwaldböden und der Waldstandorte. (A) Buchen- und Fichtenwaldböden; (B) Waldstandorte. Eine OTU besteht aus Sequenzen mit einem Aminosäureunterschied von < 7%.

Die Signifikanz der Unterschiede in der methanotrophen Diversität zwischen Buchen- und Fichtenwaldböden wurden mit β -Libshuff bestätigt (Tabelle 23). Signifikante Unterschiede zwischen zwei Genbibliotheken liegen vor, wenn einer der beiden p-Werte unterhalb des Monte-Carlo korrigierten Wertes (hier: 0,03) liegt (179). Demnach liegen im Fall Steigerwald und Unterlüß signifikante Unterschiede in der methanotrophen Diversität von Buchen- und Fichtenwaldböden vor. Im Solling sind die vorhandenen Unterschiede dagegen nicht signifikant, vermutlich aufgrund der geringen Zahl an PmoA-Sequenzen in der Fichten-Genbibliothek dieses Standorts. Beim Vergleich aller Buchen- mit allen Fichten-PmoA-Sequenzen fällt der Solling jedoch nicht ins Gewicht ($p = 0,00$).

3.5.2.1.3 Phylogenetische Zuordnung der Gensequenzen

Es wurden folgende PmoA-/AmoA-Sequenzgruppen detektiert: USC α , Cluster 6, Cluster 7 und AOB (Abbildung 14). Dabei war der Großteil der Sequenzen (299 Sequenzen, zwischen 24 und 100% pro Genbibliothek) verwandt zur PmoA von USC α . 28 Sequenzen waren nur entfernt verwandt zu bekannten PmoA-/AmoA-Sequenzen und bildeten zwei separate, tief abzweigende Cluster, die, unter Fortführung der bereits bestehenden Nomenklatur (122), Cluster 6 und Cluster 7 genannt wurden. Cluster 6 beinhaltet die bereits publizierte Umweltsequenz EU723753, die in einem Waldbestand, der sich auf vulkanischen Ablagerungen entwickelt hatte, detektiert worden war (115). Cluster 7 setzt sich ausschließlich aus Sequenzen vom Buchenwaldboden des Sollings zusammen. Aufgrund der intermediären, phylogenetischen Position von Cluster 6 und 7 zwischen bekannten PmoA- und AmoA-Sequenzclustern ist unklar, ob es sich um PmoA- oder AmoA-Sequenzen handelt. 39 AmoA-Sequenzen von AOBs wurden mit den verwendeten Primern (A189f/A682r) kodetektiert und zeigten eine nahe Verwandtschaft zur AmoA-Sequenz von *Nitrosospira briensis*, einem ammoniumoxidierenden β -Proteobakterium.

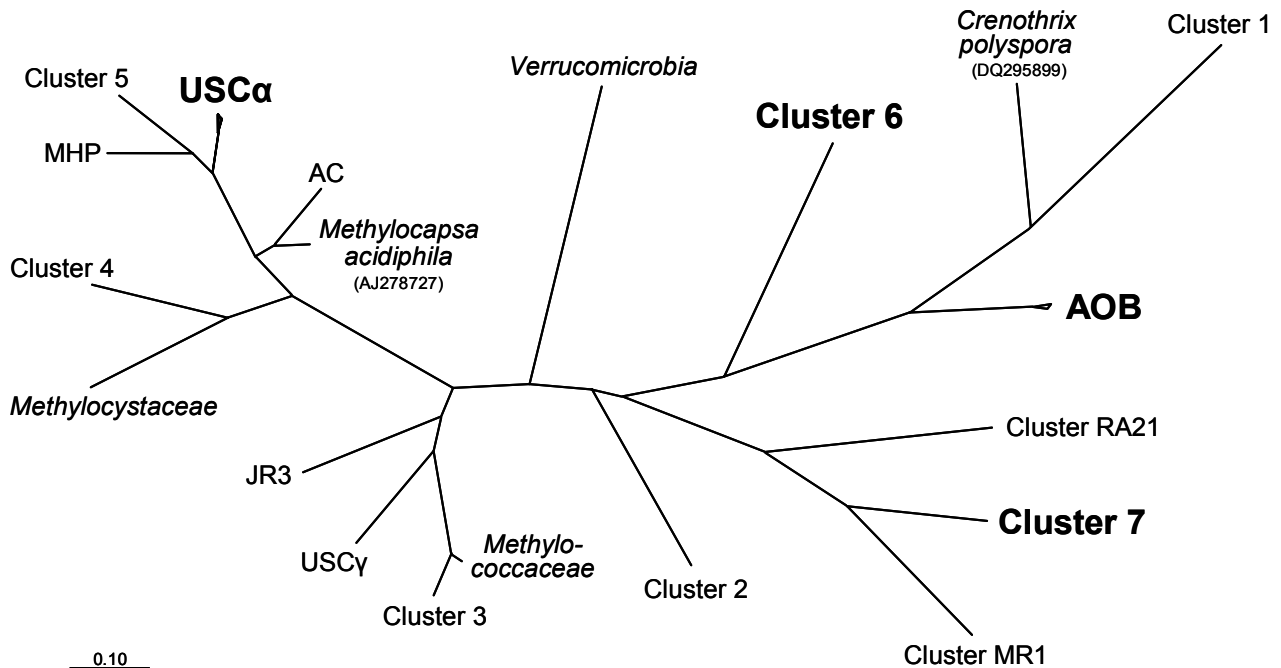


Abbildung 14: Maximum-Likelihood-Stammbaum zur Einordnung der in dieser Arbeit detektierten PmoA-Sequenzen in bekannte Gruppen von PmoA- und AmoA-Sequenzen. USC α , USC γ , Cluster 1, JR3 und Vertreter der *Methylocystaceae* sind Genotypen, die mutmaßlich atmosphärisches Methan oxidieren. Der Analyse liegen Genfragmente zwischen den Aminosäuren 59 und 206 (in Anlehnung an die PmoA-Sequenz von *Methylococcus capsulatus* str. Bath, NC_002977) zugrunde. Die Baumberechnung erfolgte mit Hilfe der in ARB integrierten PROML-Methode (137) unter Verwendung des JTT-Evolutionsmodells (108). Cluster, die Sequenzen aus dieser Arbeit enthalten, sind fett gedruckt. Die Skalierung zeigt einen Sequenzunterschied von 10% an. „Accession Numbers“ der zur Baumberechnung verwendeten Sequenzen: AF148521, AF148522, AF200729, AJ278727, AJ579669, AJ868245, AJ868259, AJ868265, AJ868278, AJ868281, AJ868409, AY550736, DQ295899, EF591085, EF644409, FJ970601, FN564735, FN564878, FN564924, FN564930, U76553, NC_002977.

Der 7%-„Cut-off“ (3.5.1), auf die im Rahmen dieser Arbeit detektierten und bereits publizierten PmoA-Sequenzen von USC α und nahe verwandter Sequenzcluster angewandt (insgesamt 406 analysierte Sequenzen), ermöglichte die Differenzierung unterschiedlicher OTUs innerhalb dieser Gruppen (Abbildung 15). Innerhalb von USC α konnten auf diese Weise zehn OTUs unterschieden werden. Dabei fielen einige der in dieser Arbeit detektierten Sequenzen, z.B. SW-B-15, mit bereits bekannten PmoA-Sequenzen in eine OTU zusammen. Andere Sequenzen, wie z.B. S-F-21, bildeten separate OTUs.

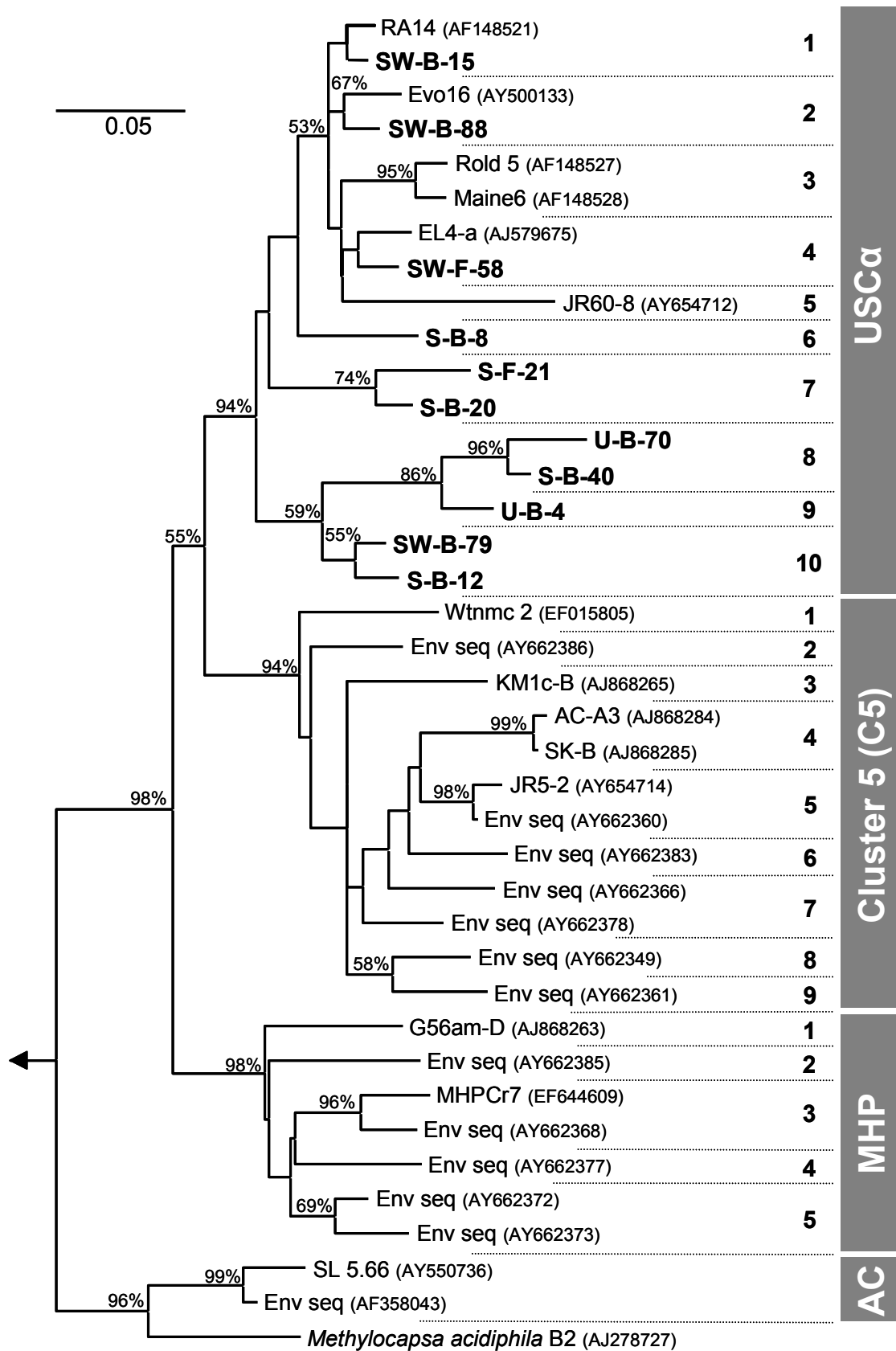


Abbildung 15: Dendrogramm der OTUs auf Artenebene innerhalb der Cluster USC α , 5, MHP, AC und des Sequenzclusters um die PmoA von *Methylocapsa acidiphila*. Der Analyse liegen 406 PmoA-Sequenzfragmente zwischen den Aminosäuren 59 bis 206 (in Anlehnung an die PmoA-Sequenz von *Methylococcus capsulatus* str. Bath, NC_002977) zugrunde. Das dargestellte Dendrogramm der ermittelten 26 OTUs (bei 7% Aminosäure-unterschied, 3.5.1) wurde mit Hilfe von MEGA4 (199) unter Verwendung der Neighbor-Joining-Methode ohne Evolutionsmodell berechnet (10.000 Bootstraps) (71). Nur Bootstrap-Werte, die größer als 50% waren, sind dargestellt. Die in dieser Arbeit detektierten Sequenzen sind fett gedruckt. „Accession Numbers“ sind in Klammern hinter den zugehörigen Sequenzen angegeben. Die Zahlen von 1-10 auf der rechten Seite benennen unterschiedliche OTUs auf Artenebene innerhalb des jeweiligen Clusters. Der Pfeil steht für die PmoA-Sequenz von *Methylococcus capsulatus* Bath (L40804), die als Referenzsequenz für die Dendrogramm-Wurzel verwendet wurde. Die Skalierung zeigt einen Sequenzunterschied von 5% an. Env seq, Umweltsequenz (environmental sequence).

Cluster 5 setzt sich aus neun unterschiedlichen OTUs zusammen. Cluster MHP (ursprünglich MHP clade) wurde nach der Herkunft der Sequenzen aus dem Moor House Peat in den Nord Penninen in England benannt. Er enthält fünf OTUs. Cluster AC (aquatischer Cluster, im Rahmen dieser Arbeit benannt) enthält Sequenzen aus verschiedenen aquatischen Habitaten und bildet bislang eine eigenständige OTU, ebenso wie der Sequenzcluster um die PmoA-Sequenz von *Methylocapsa acidiphila* B2. Die Cluster USC α , 5 und MHP repräsentieren vermutlich methanotrophe Gattungen mit unterschiedlichen Spezies.

Unter Anwendung des 7%-„Cut-offs“ wurden auf Artenebene Diversitätsunterschiede zwischen Buchen- und Fichtengenbibliotheken deutlich. Die methanotrophe Diversität in Buchenwaldböden war grundsätzlich höher als in Fichtenwaldböden (Abbildung 16). Innerhalb der Buchengenbibliotheken wurden insgesamt neun OTUs detektiert. Sieben dieser OTUs zählten zu USC α (USC α -1, -2, -6, -7, -8, -9, -10). Die beiden übrigen OTUs waren die tief abzweigenden Cluster 6 und 7. Im Gegensatz dazu war die methanotrophe Diversität in den Fichtengenbibliotheken mit nur fünf verschiedenen OTUs (USC α -1, -4, -7, -8, Cluster 6) deutlich geringer. Die am häufigsten detektierte OTU sowohl in Buchen- als auch in Fichtengenbibliotheken war USC α -1.

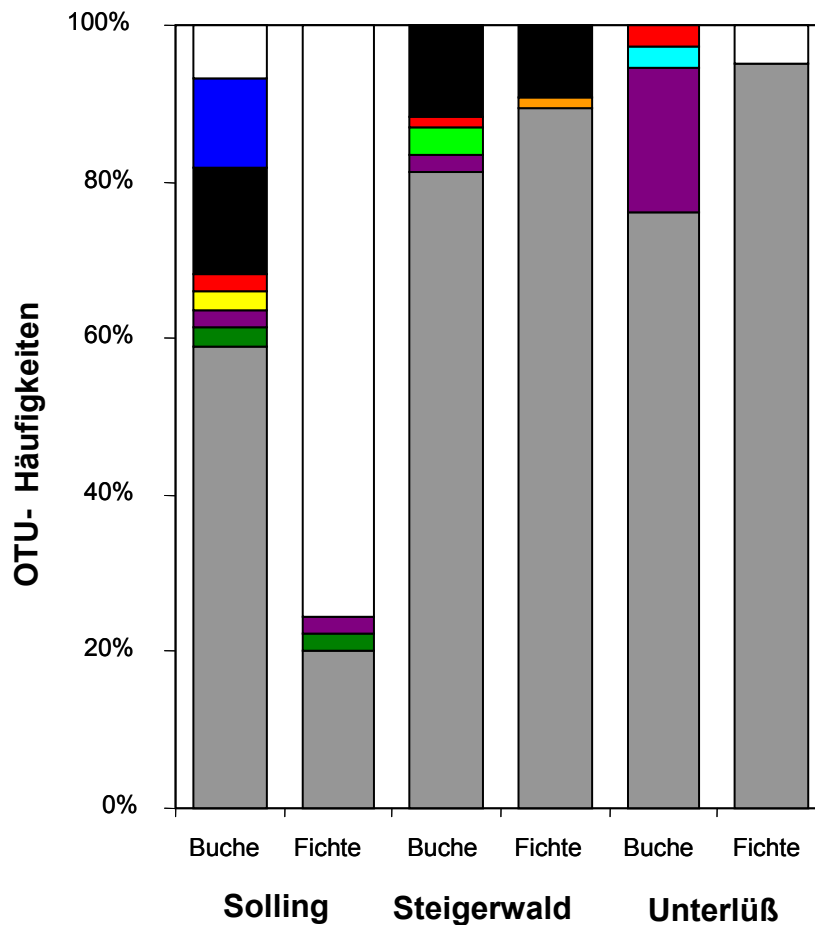


Abbildung 16: PmoA-basierte Zusammensetzung der methanotropen Lebensgemeinschaft. OTUs wurden basierend auf einem „Cut-off“ von 7% (3.5.1) definiert und ihre Häufigkeiten in den PmoA-Bibliotheken dargestellt. Der Einteilung in die OTUs liegen 406 AmoA-/PmoA-Sequenzfragmente zwischen den Aminosäuren 59 und 206 (in Anlehnung an die PmoA-Sequenz von *Methylococcus capsulatus* str. Bath, NC_002977) zugrunde. Grau, USCα-1; dunkelgrün, USCα-7; lila, USCα-8; hellgrün, USCα-2; orange, USCα-4; hellblau, USCα-9; gelb, USCα-6; rot, USCα-10; schwarz, Cluster 6; dunkelblau, Cluster 7; weiß, AOBs innerhalb der β -Proteobacteria.

3.5.2.2 *mmoX* und *pmoA* von *Verrucomicrobia*

Für keinen Standort konnten aus extrahierter, hochmolekularer Boden-DNA *mmoX*-Genfragmente amplifiziert werden. Die Amplifikation der *mmoX* von *Methylococcus capsulatus*, dessen genomische DNA als Positivkontrolle für die *mmoX*-PCR eingesetzt worden war, war jedoch erfolgreich. Auch die *in silico* Erfassung bekannter *mmoX*-Sequenzen durch die verwendeten Primer (Analyse mittels des ARB-Tools „Probe Match“) war nahezu 100%. Deshalb

kann davon ausgegangen werden, dass *mmoX*-Gene in den untersuchten Waldböden entweder nicht vorhanden waren oder dass deren Abundanz unter dem Detektionslimit der PCR lag.

Die *pmoA* der methanotrophen *Verrucomicrobia Methylacidiphilaceae* wurde ebenfalls in keiner Bodenprobe detektiert. In Ermangelung einer Positivkontrolle ist dies kein endgültiger Beweis für die Abwesenheit methanotropher *Verrucomicrobia*. Die Wahrscheinlichkeit dafür ist jedoch sehr hoch, wurden doch mehrere, spezifisch für die *pmoA1*- und *pmoA2*-Gene von *Verrucomicrobia* entwickelte Primer in unterschiedlichen Kombinationen mit Annealing zwischen 50°C und 70°C angewandt. Auch bei Zugabe von BSA konnten keine *Verrucomicrobia-pmoA*-Gene amplifiziert werden.

3.5.3 Abundanz

3.5.3.1 MPNs

Die Bestimmung der Keimzahl Methanotropher in den Waldböden war nicht erfolgreich. Trübungsmessungen deuteten auf ein Wachstum von Mikroorganismen in den Verdünnungsstufen 10^{-2} bis 10^{-4} während der ersten zwei Wochen hin. In den meisten Fällen trat nach diesem Zeitraum die maximale Trübung auf und nahm in den folgenden Wochen wieder ab. Dies deutet auf ein Wachstum nicht-methanotropher Mikroorganismen auf endogenen Kohlenstoff- und Energiequellen in der Bodensuspension hin. Offensichtlich waren die endogenen Kohlenstoff- und Energiequellen nach zwei Wochen verbraucht. Wachstum zu einem späteren Messzeitpunkt, das für eine Anreicherung Methanotropher sprechen würde, konnte bei keinem der beiden verwendeten Medien (NMS-Medium, M1 Medium, 2.7) beobachtet werden, weder bei 50 ppm noch 10% Methan. Auf einen experimentellen Nachweis, ob es sich bei den Anreicherungen um Methanotrophe handelt (Methanoxidation oder *pmoA*-PCR einzelner Replikate), wurde deshalb verzichtet.

3.5.3.2 qPCR

Zur Quantifizierung der *pmoA*-Gene von USC α , der *pmoA*-/*amoA*-Gene von Cluster 7 und der *amoA*-Gene von AOB wurden neue, genotypspezifische qPCR-Assays (Q-USC α , Q-C7, Q-AOB) etabliert. Für die Quantifizierung der Bakterien wurde ein bereits publizierter Assay herangezogen und leicht modifiziert (219). Mit Hilfe des ebenfalls neu entwickelten Assays INHIB-CORR wurden sämtliche, mit den genotypspezifischen Assays (Q-USC α , Q-C7, Q-AOB,

BACTERIA) gemessenen Genzahlen um einen Faktor korrigiert, der die Inhibition der qPCR (z.B. durch koextrahierte Huminsäuren) berücksichtigt. Aufgrund der hohen Variabilität der DNA-Konzentration bei triplikaten DNA-Extrakten und innerhalb einer Waldfläche wurden sämtliche Genzahlen auf die DNA-Konzentration bezogen ($\text{Gene ng}_{\text{DNA}}^{-1}$). Werte bezogen auf $\text{g}_{\text{TG}}^{-1}$ dienen nur der Vergleichbarkeit der Genzahlen mit bereits publizierten Werten.

3.5.3.2.1 Qualität des qPCR-Assays Q-USCα

Mit Hilfe einer *in silico* Analyse wurde der neu entwickelte qPCR-Assay Q-USCα hinsichtlich der Erfassung bekannter *pmoA*-Genfragmente mit dem bereits publizierten FOREST-Assay (124) verglichen. Anhand von zwei Bodenproben vom Steigerwald (Buche und Fichte) wurden außerdem die tatsächlich gemessenen Genzahlen mit beiden Assays gegenüber gestellt (Tabelle 24). Q-USCα wurde dabei wie unter 2.8.3.2 beschrieben angewendet, d.h. inklusive Korrektur durch INHIB-CORR. Assay FOREST wurde mit Verdünnungsreihen der DNA-Extrakte von 1:100 bis 1:1000 nach Angaben des Entwicklers verwendet (124).

Tabelle 24: Vergleich der qPCR-Assays Q-USCα und FOREST hinsichtlich Erfassung von USCα-*pmoA*-Sequenzen und tatsächlich detektierter *pmoA*-Genzahlen

Assay	Erfassung von USCα-Sequenzen generell ^{c,d}	Erfassung von in dieser Arbeit detektierten USCα-Sequenzen ^{c,e}	<i>pmoA</i> -Genzahlen ($\times 10^3 \text{ Gene ng}_{\text{DNA}}^{-1}$) ^f	
			Buche	Fichte
Q-USCα ^a	97%	98%	8,8	6,4
FOREST ^b	81%	86%	1,1	0,9

^a diese Arbeit

^b (124)

^c In die Analyse gingen nur Sequenzen ein, die sich in mindestens einem Basenpaar unterschieden.

^d 376 Sequenzen

^e 277 Sequenzen

^f DNA-Extrakte von jeweils drei Bodenkernen pro Waldfläche wurden gemischt und als Matrice für die qPCR eingesetzt. *pmoA*-Genzahlen stellen Mittelwerte aus jeweils drei qPCR-Reaktionen dar.

Nahezu alle bereits bekannten und in dieser Arbeit detektierten USCα-*pmoA*-Sequenzen werden *in silico* von den neuen Primern erfasst. Q-USCα erfasst deutlich mehr USCα-*pmoA*-Sequenzen als FOREST. Dies wird durch die gemessenen *pmoA*-Genzahlen in zwei

Beispielbodenproben bestätigt. Die Genzahlen, die mit Hilfe von Q-USCα gemessen wurden, sind bis zu acht Mal höher als die mit FOREST gemessenen Genzahlen.

3.5.3.2.2 Genzahlen

Die *pmoA*-/*amoA*-Genzahlen von Cluster 7 lagen unterhalb des Detektionslimits des entsprechenden qPCR-Assays (8.8×10^{-1} Gene $\text{ng}_{\text{DNA}}^{-1}$). Die *pmoA*-Genzahlen von USCα variierten von $1,3 \times 10^3$ bis $3,3 \times 10^3$ *pmoA*-Gene $\text{ng}_{\text{DNA}}^{-1}$ bzw. $0,3 \times 10^8$ bis $1,2 \times 10^8$ *pmoA*-Gene $\text{g}_{\text{TG}}^{-1}$ (Abbildung 17A). In Buchenwaldböden waren die Genzahlen gegenüber den Fichtenwaldböden leicht erhöht ($p > 0,05$). Die Abundanz der *amoA*-Gene in den Bodenproben übertraf die der *pmoA*-Gene um den Faktor zehn (Abbildung 17B). Die *amoA*-Genzahlen lagen im Bereich zwischen $1,3 \times 10^4$ und $3,7 \times 10^4$ *amoA*-Gene $\text{ng}_{\text{DNA}}^{-1}$ bzw. $0,3 \times 10^9$ und $2,6 \times 10^9$ *amoA*-Gene $\text{g}_{\text{TG}}^{-1}$. In Bodenproben von Steigerwald und Unterlüß war die Abundanz von *amoA* ähnlich. Die höchste Anzahl von *amoA*-Genen wurde in den Bodenproben des Fichtenbestandes im Solling detektiert und war signifikant höher als unter Buche ($p < 0,05$). Die Abundanz der 16S rRNA Gene war in den Fichtenwaldproben höher als in den jeweiligen Buchenwaldproben (Abbildung 17C). Die gemessenen Genzahlen variierten zwischen $0,4 \times 10^6$ und $1,1 \times 10^6$ 16S rRNA Gene $\text{ng}_{\text{DNA}}^{-1}$ bzw. $6,3 \times 10^9$ und $7,2 \times 10^{10}$ 16S rRNA Gene $\text{g}_{\text{TG}}^{-1}$.

Unter der Annahme, dass USCα-Zellen wie bereits kultivierte Methanotrophe zwei *pmoA*-Kopien pro Genom besitzen (196) und ein Bakteriengenom im Schnitt 4,13 16S rRNA Genkopien (116), lässt sich aus den gemessenen *pmoA*-Genzahlen der Anteil von USCα an der gesamten bakteriellen Gemeinschaft berechnen. Dieser beträgt bis zu 2% in Buchenwaldböden, jedoch nur maximal 0,5% in Fichtenwaldböden.

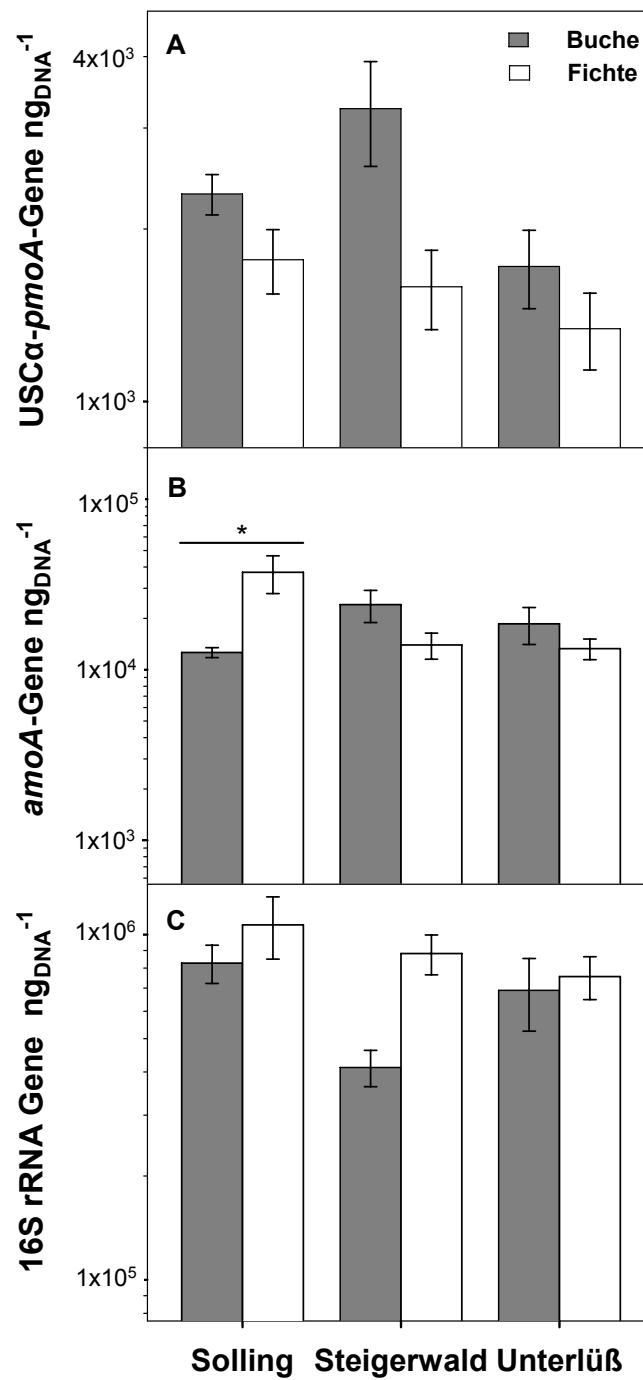


Abbildung 17: *pmoA*-, *amoA*- und 16S rRNA Genzahlen in Buchen- und Fichtenwaldböden von Solling, Steigerwald und Unterlüß. (A) *pmoA*; (B) *amoA*, (C) 16S rRNA. Genzahlen wurden mittels qPCR bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardabweichung aus fünf Raumreplikaten und jeweils triplikat DNA-Extraktionen und qPCR-Reaktionen. *, signifikante Unterschiede zwischen Buchen- und Fichtenwaldböden ($p < 0,05$, Mann-Whitney-U-Test).

3.6 Zellspezifische Aktivität von USC α

Zur Berechnung atmosphärischer Methanoxidationsraten pro USC α -Zelle wurden die in 3.2.3 ermittelten, atmosphärischen Methanoxidationsraten im O_a-Horizont und 0-5 cm Mineralboden für die einzelnen Waldstandorte gemittelt und durch die entsprechenden Zellzahlen von USC α geteilt (3.5.3.2.2, Genzahlen wurden halbiert) (196). Bei Solling und Unterlüß war die ermittelte zellspezifische Aktivität in den Buchen- höher als in den Fichtenwaldböden (Tabelle 25). Nur im Steigerwald war die berechnete zellspezifische Aktivität in Buchen- und Fichtenwaldböden identisch.

Tabelle 25: Zellspezifische atmosphärische Methanoxidationsraten von USC α in Buchen- und Fichtenwaldböden von Solling, Steigerwald und Unterlüß.

Standort	Zellspezifische Methanoxidationsrate ($\times 10^{-18}$ mol CH ₄ Zelle ⁻¹ h ⁻¹)	
	Buche	Fichte
Solling	6.9 \pm 1.5	1.5 \pm 0.3
Steigerwald	14.0 \pm 2.6	14.2 \pm 2.1
Unterlüß	4.1 \pm 0.7	1.8 \pm 0.4

4 DISKUSSION

4.1 Einfluss der Baumart auf die Methanoxidation

4.1.1 Methanoxiderationsraten von Buchen- und Fichtenwaldböden

Die dominierende Baumart eines Waldes wirkt sich auf die Aufnahme atmosphärischen Methans des Waldbodens aus. In Laubwaldböden werden bis zu drei Mal höhere atmosphärische Methanaufnahmeraten gemessen als in Nadelwaldböden. (28, 30, 33, 147, 169). Dementsprechend waren auch in dieser Arbeit die Methanoxiderationsraten der untersuchten Buchenstandorte generell höher als die der benachbarten Fichtenstandorte (Solling, Steigerwald und Unterlüß, 3.2). Die untersuchten Laub- und Nadelgehölzbestände hatten sich jeweils auf identischen Bodentypen entwickelt und waren den gleichen klimatischen Bedingungen ausgesetzt (Tabelle 2, 2.2, 3.1). Die beobachteten Unterschiede in der Methanaufnahme dieser Böden waren unabhängig von Temperatur und Matrixpotenzial (3.2.2, 146). Bei einem konstanten Matrixpotenzial von -65 kPa sind alle Poren mit einem Durchmesser von mehr als 5,6 µm entwässert (19), so dass bei allen Bodenkernen die gleichen diffusiven Bedingungen für Methan und Sauerstoff herrschten. Daraus kann der Schluss gezogen werden, dass es sich bei den beobachteten Unterschieden in den Methanoxiderationsraten von Laub- und Nadelwäldern um einen Effekt baumartabhängiger Faktoren handelt.

Die Unterschiede der atmosphärischen Methanoxiderationsraten von Buchen- und Fichtenwaldbodenkernen (3.2.2.1) waren, verglichen mit bereits publizierten Feldmessungen, gering (28, 33, 147). *In situ* wurden die größten Unterschiede zwischen Buchen- und Fichtenwaldboden vom Standort Unterlüß während der Sommermonate bei einem Matrixpotenzial von -580 kPa verzeichnet (28). Das an die Mikrokosmen angelegte Matrixpotenzial von -65 kPa war vermutlich zu hoch, um signifikante Unterschiede in der atmosphärischen Methanoxiderationsrate zwischen Buchen- und Fichtenwaldböden detektieren zu können. Eine weitere Erniedrigung des Matrixpotenzials war jedoch mit der verwendeten Mikrokosmenapparatur technisch nicht möglich. Bei einem Matrixpotenzial unterhalb von -65 kPa wurde zum Druckausgleich Luft aus dem Innern der Mikrokosmen angesaugt und eine kontinuierliche Begasung der Mikrokosmen dadurch verhindert.

Die Erhöhung der Methankonzentration hat einen ähnlichen Effekt wie das Absenken des Wassergehalts in den Bodenkernen: die Methanverfügbarkeit für die Methanotrophen in den

Waldböden wird gesteigert. Die Michaelis-Menten-Kinetiken zeigten ein deutlich höheres Methanoxidationspotenzial in Buchenwaldbodenkernen (3.2.2.2, Abbildung 7). Die kinetischen Parameter $V_{\max(\text{app})}$ und $K_{\text{M}(\text{app})}$ waren für die Buchenwaldbodenkerne der Standorte Steigerwald und Unterlüß zwei bis drei Mal so hoch wie für die Fichtenwaldbodenkerne (Tabelle 18). Unterschiedliche $V_{\max(\text{app})}$ - und $K_{\text{M}(\text{app})}$ -Werte deuten auf Unterschiede in der Zusammensetzung und Abundanz Methanotropher in Buchen- und Fichtenwaldböden hin. Die $K_{\text{M}(\text{app})}$ -Werte (16-64 $\mu\text{g m}^{-2}$ bzw. 35-137 ppm) liegen im Bereich bereits publizierter $K_{\text{M}(\text{app})}$ -Werte für belüftete Böden (4-97 ppm) (13, 14, 45, 80, 106, 110, 172, 176). Im Gegensatz dazu besitzen methanotrophe Reinkulturen K_{M} -Werte von bis zu 7.300 ppm Methan (sMMO von *Methylococcus capsulatus* str. Bath) (34).

Die *in situ* Methanoxidationsraten im Steigerwald (82-110 $\mu\text{g CH}_4 \text{ m}^{-2} \text{ h}^{-1}$) waren zwei bis drei Mal so hoch wie die mit der Mikrokosmenanlage gemessenen Raten (29-35 $\mu\text{g CH}_4 \text{ m}^{-2} \text{ h}^{-1}$). Bei der *in situ* Messung handelte es sich um eine einzelne Messung an einem heißen, trockenen Sommertag. Das Matrixpotenzial des Bodens lag an diesem Tag vermutlich deutlich unterhalb des an die Mikrokosmen angelegten Matrixpotenzials von -65 kPa. Die höheren *in situ* Methanoxidationsraten sind somit wahrscheinlich eine Folge des niedrigen Matrixpotenzials bzw. Wassergehalts des Bodens, da Matrixpotenzial und Wassergehalt eines Bodens die Methanoxidation stark beeinflussen (2, 141, 184). Die Werte beider Experimente sind jedoch in der Größenordnung bereits publizierter Studien (bis zu 288 $\mu\text{g CH}_4 \text{ m}^{-2} \text{ h}^{-1}$) (190). Für den Buchen- und Fichtenstandort im Unterlüß wurden *in situ* Methanoxidationsraten von 48 bzw. 21 $\mu\text{g CH}_4 \text{ m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ berichtet (28). Auch die gemessenen atmosphärischen Methanoxidationsraten gestörter Bodenproben liegen im Bereich bereits publizierter Werte (0,3 bis 25 $\text{ng CH}_4 \text{ g}_{\text{TG}}^{-1} \text{ h}^{-1}$) (33, 183, 189).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, (i) dass, entsprechend Hypothese 1, Methanoxidationsraten an allen drei Waldstandorten in Fichtenwaldböden niedriger waren als in Buchenwaldböden und (ii) dass die detektierten Unterschiede in der Methanoxidationsrate unabhängig von der Messmethode (Haubenmethode, Mikrokosmenanlage und gestörte Bodenproben), dem Waldstandort (Solling, Steigerwald und Unterlüß) und dem Probennahmezeitpunkt (Juni, August und Oktober) waren.

4.1.2 Vertikale Verteilung der Methanoxidation in Waldböden

Die höchste methanotrophe Aktivität in temperaten Waldböden wird meist im oberen Mineralboden lokalisiert (15, 28, 45, 169, 174), in welchem sich die Methankonzentration sogar im subatmosphärischen Bereich bewegt (2, 30, 60). In Bodenproben von Solling, Steigerwald und Unterlüß wurde die höchste methanotrophe Aktivität entweder in den oberen 5 cm des Mineralbodens oder im O_a-Horizont (unter Buche) nachgewiesen (Abbildung 8). Mit zunehmender Bodentiefe nahm auch das Methanoxidationspotenzial der Böden ab. Der O_a-Horizont in Buchenwaldböden stellte den einzigen organischen Horizont mit der Fähigkeit zur Oxidation atmosphärischen Methans dar. In vergleichbaren Studien wurde hiervon bislang nicht berichtet, da entweder die komplette organische Auflage vor Zerteilung der Bodenkerne entfernt wurde (169) oder die organische Auflage zwar untersucht, jedoch nicht in verschiedene Horizonte untergliedert wurde (28, 174). Im O_i- und O_e-Horizont beider Waldtypen sowie im O_a-Horizont unter Fichte konnte keine methanotrophe Aktivität verzeichnet werden, was auf die Abwesenheit oder geringe Abundanz von Methanotrophen in diesen Horizonten hindeutet. Dies wird durch die Analyse der PLFAs Methanotropher in Kombination mit SIP in einem Kiefernwaldboden unterstützt (16). In der organischen Auflage dieses Kiefernwaldbodens erfolgte lediglich eine geringe Aufnahme des schweren ¹³C-Methans in PLFAs, wohingegen im oberen Mineralboden signifikante Mengen ¹³C-Methan in USCα-spezifische PLFAs inkorporiert wurden. O_i- und O_e-Horizont sowie der O_a-Horizont unter Fichte fungieren als Diffusionsbarriere für Methan und Sauerstoff in den Boden. Da methanotrophe Bakterien in Waldböden nach bisherigem Kenntnisstand atmosphärisches Methan als einzige Kohlenstoff- und Energiequelle nutzen (85), sollte man jedoch erwarten, dass die höchste methanotrophe Aktivität in den oberen organischen Bodenhorizonten lokalisiert ist. Inhibitorische organische und anorganische Verbindungen könnten eine Verlagerung der Methanotrophen in tiefere Horizonte und das unterschiedliche Methanoxidationspotenzial des O_a-Horizonts in Buchen- und Fichtenwaldböden bewirken (4, 104, 105). Denkbar wäre auch, dass es atmosphärischen Methanoxidierern aufgrund ihres langsamen Wachstums (166) nicht möglich ist, die oberen, sich schnell zersetzenden, organischen Horizonte zu besiedeln. Hinzu kommt, dass die oberen Horizonte eines Bodens Temperaturschwankungen und Änderungen im Wassergehalt besonders stark ausgesetzt sind. Der O_a-Horizont (Buche) und obere Mineralboden könnten somit für die Methanotrophen in Waldböden eine ökologische Nische mit konstanteren Umweltbedingungen und trotzdem ausreichender Methanversorgung darstellen.

4.2 Umweltfaktoren mit Einfluss auf die atmosphärische Methanoxidation

4.2.1 Organische Auflage

Die Entfernung der organischen Auflage der Bodenkerne führte zu einem leichten Anstieg in der Oxidationsrate atmosphärischen Methans (3%, 3.3.1, Tabelle 19). Dies bestätigt, dass die organische Auflage als Diffusionsbarriere für Methan und Sauerstoff in den Boden fungiert (Abbildung 8). In verschiedenen europäischen Waldböden bewirkte die Entfernung der Auflage einen Anstieg der Methanoxiderationsrate von bis zu 171% (26, 33, 174, 189). Der im Rahmen dieser Arbeit detektierte, viel geringere Effekt ist vermutlich auf die verwendete Mikrokosmenanlage zurückzuführen. Die Bodenstruktur macht einen vollkommen gasdichten Abschluss zwischen Bodenkern und Plexiglasröhre unmöglich. Ein Teil des Methans und Sauerstoffs kann somit entlang der Plexiglasröhre in tiefere Bodenschichten diffundieren. Der Anstieg der Methanoxiderationsrate bei Entfernung der organischen Auflage war für Buchen- und Fichtenbodenkerne vergleichbar. Auch hinsichtlich der Mächtigkeit der organischen Auflage waren die beiden Waldtypen identisch. Bei feuchten Bedingungen ist jedoch die Diffusion von Methan und Sauerstoff in den Boden unter Buche tendenziell geringer als unter Fichte, da zusammen klebende Buchenblätter eine effektivere Diffusionsbarriere bilden können als Koniferennadeln (24). Somit ist es unwahrscheinlich, dass die niedrigere Methanaufnahme in Fichtenwaldböden auf ein vermindertes Gasdiffusionsvermögen durch die organische Auflage dieser Böden zurückzuführen ist.

4.2.2 pH-Wert

In Nadelwäldern ist die Bodenversauerung in der Regel stärker ausgebildet als in Laubwäldern (7, 173). Ein neutraler pH-Wert kann sich zudem positiv auf die atmosphärische Methanoxidation in Waldböden auswirken (175). Die Böden aller untersuchten Wälder waren sauer (3.3.2, Tabelle 20), was typisch für viele mitteleuropäische Waldböden ist (19). In den Böden von Steigerwald und Unterlüß waren der O_a-Horizont und der obere Mineralboden, die Bodenhorizonte, die die höchste methanotrophe Aktivität aufwiesen, auch die sauersten Horizonte. Mit Ausnahme des Sollings waren die pH-Werte erwartungsgemäß in Fichtenwaldböden im Vergleich zu den Buchenwaldböden leicht erniedrigt. Die Unterschiede waren jedoch minimal (im Schnitt 0,3 pH-Einheiten) und können in Bezug auf ihre Auswirkung auf die Methanoxidation in Buchen- und Fichtenwaldböden vernachlässigt werden. Die erhöhten pH-Werte im Solling-

Fichtenstandort sind auf die etwa 25 Jahre zurückliegende Kalkung dieses Bestandes zurückzuführen (etwa 25 t ha^{-1} , mündliche Kommunikation: Werner Borken). Da ein erhöhter pH-Wert die Methanoxidation in Waldböden fördert (175), könnte die Kalkung der Grund dafür sein, dass, im Gegensatz zu den Standorten Steigerwald und Unterlüß, die Methanoxidationsraten im Mineralboden des Solling-Fichtenbestands höher waren als im Buchenbestand (Abbildung 8). Ungeachtet dieser Diskrepanz der Daten vom Solling, lassen die Ergebnisse der pH-Analyse den Schluss zu, (i) dass Methanotrophe in diesen Waldböden an niedrige pH-Werte angepasst sind (5, 176) und (ii) dass der pH-Wert nicht verantwortlich für die Unterschiede im Methanoxidationspotenzial (3.2), der Diversität (3.5.2.1) und der Abundanz Methanotropher (3.5.3.2.2) in Buchen- und Fichtenwaldböden ist.

4.2.3 Ammonium

Ammonium ist ein Substratanalogon für die MMO und führt zu einer kompetitiven Inhibition der Methanoxidation (12, 34, 61). Die Düngung von Waldböden mit großen Mengen Ammonium bewirkt deshalb meist eine Abnahme der atmosphärischen Methanaufnahme (20, 80, 194, 203). Der inhibitorische Effekt von Ammonium auf die Methanoxidation in Waldböden liegt bei 12 bis 86% (80, 105). Die Reduzierung der Ammoniumeinträge in einen Fichtenbestand im Solling brachte nach sieben Jahren keine Erholung der atmosphärischen Methanaufnahme (25). Im Gegensatz dazu wurde bei kontinuierlicher Zugabe von geringen Ammoniumkonzentrationen zu einem Waldboden (Nachahmung der atmosphärischen Deposition) kein signifikanter Effekt auf die Methanoxidation detektiert (31), da Ammonium im Boden vermutlich rasch von AOB umgesetzt wird (25, 33, 110). Die Rolle von Ammonium auf die atmosphärische Methanoxidation ist somit bislang nicht ausreichend geklärt.

Der Ammoniumeintrag ist in der Regel in Nadelwäldern höher als in Laubwäldern (29, 173), da Nadelbäume immergrün sind und so der Auskämmeffekt der Baumkronen für stickstoffhaltige Luftschadstoffe vor allem im Winter größer ist als in Laubwäldern. Es ist jedoch unwahrscheinlich, dass Ammonium in den untersuchten Waldböden für die unterschiedlichen Methanoxidationsraten unter Buche und Fichte verantwortlich ist. Die Ammoniumkonzentration im O_a -Horizont und 0-5 cm Mineralboden (Bodentiefen mit den größten Unterschieden in der atmosphärischen Methanoxidationsrate) der Standorte Solling, Steigerwald und Unterlüß war in Buchen- und Fichtenbeständen ähnlich oder sogar höher unter Buche (3.3.3, Tabelle 21). Einzige Ausnahme hierbei bildete der O_a -Horizont vom Standort Solling. Unter Fichte war hier die

Ammoniumkonzentration 13 Mal höher als unter Buche. Dementsprechend übertraf auch die Abundanz von AOB die der übrigen Standorte (3.5.2.1.1, 3.5.3.2). Die Ursache hierfür ist vermutlich in der Kalkung der Solling-Fichtenfläche vor etwa 25 Jahren zu suchen (etwa 30 t ha⁻¹, mündliche Kommunikation: Werner Borken), die sich bis heute noch auswirkt (einziger Standort mit höherem pH-Wert der Fichtenfläche). Die Kalkung eines Waldbodens führt zur Steigerung der Stickstoffmineralisierung (42) und fördert so die Nitrifikation und das Wachstum von AOB.

4.2.4 Ethylen

Neben Ammonium wird auch Ethylen eine Schlüsselrolle bei der Regulation der atmosphärischen Methanoxidation in Böden zugesprochen, da es ebenfalls in einer unspezifischen Nebenreaktion von der MMO oxidiert wird und so zur Inhibierung der Methanoxidation führt (12, 104). Ethylen akkumuliert in Böden unter anoxischen Bedingungen (3.3.4, 185, 217, 220). Bei Trockenheit übersteigt die Ethylenabbaurate der Böden die -bildungsrate (220). Dementsprechend emittierten die Waldböden vom Solling, Steigerwald und Unterlüß unter oxischen Bedingungen kein Ethylen. Die Bildung von Ethylen erfolgte unter anoxischen Bedingungen, hauptsächlich im O_i- und O_e-Horizont. Waldböden müssen jedoch extrem nass werden, um vollständig anoxisch zu werden, Bedingungen, unter denen sowieso keine Methanoxidation stattfindet, und die *in situ* selten sind. Hinzu kommt, dass die Ethylenkonzentrationen der Buchen- und Fichtenwaldbodenproben in allen Bodentiefen vergleichbar oder höher unter Buche waren. Von einem positiven Effekt von Ethylen auf die Methanoxidation wurde bislang nicht berichtet, er ist jedoch aufgrund der unspezifischen Oxidation von Ethylen durch die MMO unwahrscheinlich. Es kann somit ausgeschlossen werden, dass Ethylen unterschiedliche Methanaufnahmeraten und Unterschiede in der Struktur der methanotrophen Lebensgemeinschaft in Buchen- und Fichtenwaldböden bewirkt.

Die Beschaffenheit der organischen Auflage, der pH-Wert, Ammonium und Ethylen konnten als Ursache für die Aktivitätsunterschiede in Buchen- und Fichtenwaldböden ausgeschlossen werden (4.2.1, 4.2.2, 4.2.3, 4.2.4). Hypothese 2 wurde somit widerlegt.

4.2.5 Monoterpene

Monoterpene sind wichtige Bestandteile ätherischer Öle und Harze von Koniferen und werden vorwiegend in deren Nadeln und verletzten Wurzeln nachgewiesen (136, 141). Auch im Mineralboden von Nadelwaldböden sind geringe Mengen Monoterpene zu finden. In Laubwaldböden ist die Monoterpenkonzentration dagegen minimal (141). Monoterpene wirken antibakteriell und antifungell (6, 84, 135). Der Inhibitionsmechanismus ist nicht vollständig aufgeklärt; man geht jedoch davon aus, dass sie die Zerstörung der Plasmamembran von Zellen bewirken (6, 206). Monoterpene beeinflussen eine Vielzahl ökologischer Prozesse in Böden. Neben Inhibition der Methanoxidation (4, 141) sind Monoterpene auch inhibitorisch für die Nitrifikation (214) und die Aktivität saprophytischer Pilze (135). Monoterpene können jedoch von einigen Organismen auch als Kohlenstoffquelle genutzt werden (141). Bei Ectomycorrhiza-Pilzen wurden neben negativen (wachstumshemmende) auch positive Effekte (gesteigerte Besiedlung von Fichtenwurzeln) von Monoterpenen beobachtet (136, 145).

Eine an diese Arbeit angegliederte Untersuchung des Inhibitionspotenzials verschiedener Monoterpene im Hinblick auf die Methanoxidation in Bodenproben des Buchen- und Fichtenstandorts im Steigerwald ergab, dass die *in situ* Konzentration der Monoterpene unter Fichte ausreichend ist, um Unterschiede in der Methanoxidation von einem Faktor zwei bis drei erklären zu können (141). Denkbar wäre auch, dass hohe Monoterpenkonzentrationen im O_a-Horizont der Fichtenstandorte bewirken, dass in diesem Horizont, im Gegensatz zu Buchenstandorten, keine atmosphärische Methanoxidation stattfindet (3.2.3). Aufgrund des hohen Monoterpengehalts von verletzten Koniferenwurzeln (141) stellte sich die Frage, ob Koniferenwurzeln Monoterpene abgeben und so eine Reduzierung der atmosphärischen Methanoxidation in der Rhizosphäre bewirken. Die Inkubation von Rhizosphärenproben und Bodenproben ohne direkten Wurzeleinfluss brachte jedoch keine eindeutigen Ergebnisse (3.2.4, Abbildung 9). Eine Erklärungsmöglichkeit ist, dass Fichtenwurzeln keine Monoterpene emittieren und die beobachteten Unterschiede bei der ersten Probennahme nur darauf zurückzuführen sind, dass nicht darauf geachtet wurde, beide Probenotypen aus der gleichen Bodentiefe zu entnehmen. In diesem Fall werden Monoterpene vielleicht nur bei Verletzung der Wurzeln (Fraßschäden, mechanische Verletzung durch Waldwirtschaft) als Abwehrstoff abgegeben. Falls Wurzeln Monoterpene in die Rhizosphäre abgeben, könnte eine saisonale Variabilität in der Monoterpenproduktion und -abgabe über die Wurzeln bestehen. Die Abgabe von Monoterpenen könnte außerdem auf bestimmte Wurzeltypen beschränkt sein (z.B. Feinwurzeln).

Das Monoterpenspektrum von *Picea abies* scheint geographischer Variation zu unterliegen (96, 134, 141). β -Pinen zählt zu den häufigsten Monoterpenen (57, 75). Es machte den größten Anteil der Monoterpene in Fichtenwurzeln vom Steigerwald aus, wurde aber auch in den Fichtennadeln detektiert (141). Außerdem zeigte es den größten inhibitorischen Effekt auf die Methanoxidation in Steigerwaldbodenproben (141). Bereits bei einer β -Pinen-Konzentration, die dem Fünffachen der *in situ* Konzentration im Mineralboden des Steigerwald-Fichtenbestands entspricht, fand in Buchenwaldproben keine Methanoxidation mehr statt (3.4). Inwiefern die Expression der pMMO von USC α von β -Pinen beeinflusst wird, konnte aufgrund methodischer Probleme nicht bestimmt werden. Bei *Methylocystis*-Spezies, die zwei Isozyme der pMMO besitzen, wird die pMMO₂, die atmosphärisches Methan verwertet, konstitutiv exprimiert (8). Dies lässt vermuten, dass auch die pMMO von USC α dauerhaft exprimiert wird, um die niedrigen verfügbaren Substratkonzentrationen, in diesem Fall subatmosphärische Konzentrationen von Methan, sofort oxidieren zu können. Ob sich Monoterpene direkt auf die Expression der pMMO auswirken, ist unklar, da der inhibitorische Effekt dieser Verbindungen nicht auf Methanotrophe beschränkt ist (6, 84, 135). Aber auch die Zerstörung der Plasmamembran und damit das Abtöten der Zellen (6, 206) würde zu einem Abfall der Zahl der *pmoA*-Transkripte führen. Selbst bei solch einem unspezifischen Wirkungsmechanismus wären Methanotrophe aufgrund ihres langsamen Wachstums stark betroffen (166). Da Monoterpene jedoch nicht generell inhibierend wirken (sie steigern beispielsweise die Besiedlung von Fichtenwurzeln durch Ectomycorrhiza-Pilze) (136), scheint ihr Wirkungsmechanismus wesentlich komplexer und spezifischer zu sein.

Monoterpenkonzentrationen in Fichtenwaldböden sind ausreichend, um die Unterschiede in der atmosphärischen Methanaufnahme in Buchen- und Fichtenwaldböden zu erklären. Es kann geschlussfolgert werden, dass die von der Fichte produzierten Monoterpene mit hoher Wahrscheinlichkeit Ursache für die erniedrigten atmosphärischen Methanoxideraten sind. Im Rahmen dieser Arbeit konnte jedoch nicht geklärt werden, ob Monoterpene über Fichtenwurzeln in den Boden abgegeben werden und dort zu einer Hemmung der atmosphärischen Methanoxidation in der Rhizosphäre führen, und ob Monoterpene, insbesondere β -Pinen, die Expression der pMMO inhibieren (Hypothese 3, nicht geklärt).

4.3 Diversität und Abundanz atmosphärischer Methanoxidierer

USC α ist der am häufigsten detektierte *pmoA*-Sequenztyp in Waldböden (103, 119, 122, 123). So war auch der Großteil der in den Genbibliotheken vom Solling, Steigerwald und Unterlüß detektierten *pmoA*-Sequenzen USC α zuzuordnen (3.5.2.1). Mit Hilfe des im Rahmen dieser Arbeit ermittelten „Cut-offs“ zur Differenzierung methanotropher OTUs auf Artenebene (3.5.1) konnten innerhalb von USC α zehn OTUs (USC α 1-10) identifiziert werden (Abbildung 15). Fünf dieser OTUs wurden ausschließlich aus den *pmoA*-Sequenzen der Genbibliotheken vom Solling, Steigerwald und von Unterlüß gebildet und repräsentieren neue Genotypen innerhalb von USC α . Drei andere Sequenztypen bildeten eine OTU mit bereits bekannten *pmoA*-Sequenzen. Die meisten *pmoA*-Sequenzen waren USC α -1 zuzuordnen, welcher der dominante Genotyp in den untersuchten Waldböden war. Diese OTU beinhaltet die Umweltsequenz RA14, die erste *pmoA*-Sequenz, die mit atmosphärischer Methanoxidation in Waldböden in Verbindung gebracht wurde (95).

Die Tatsache, dass Buchen- und Fichtenwälder, die den gleichen klimatischen Bedingungen ausgesetzt sind, sich auf gleichen Böden entwickelt haben und die gleiche Menge Substrat zur Verfügung haben, unterschiedliche Methanoxidationsraten zeigen, legt die Vermutung nahe, dass sie sich hinsichtlich der Zusammensetzung, Diversität und/oder Biomasse der Methanotrophen unterscheiden. Die Diversität der *pmoA*-Genfragmente in den Genbibliotheken war an allen drei Standorten unter Buche höher als unter Fichte (3.5.2.1). Mit Ausnahme des Solling konnten die Diversitätsunterschiede mit Hilfe von J-Libshuff statistisch abgesichert werden. Die Zahl der *pmoA*-Sequenzen in der Solling-Fichte-Genbibliothek war mit elf Sequenzen sehr gering (76% aller Sequenzen waren kodetektierte *amoA*-Sequenzen), so dass die Diversität am Fichtenstandort im Solling leicht unterschätzt sein könnte. Die Diversitätsunterschiede traten vorwiegend auf Artenebene in den weniger abundanten OTUs auf. USC α -2, -6, -9, -10 und Cluster 7 wurden nur in Buchenwaldböden detektiert. Hierbei könnte es sich um Genotypen handeln, die sensibler auf die Anwesenheit von Monoterpenen reagieren als USC α -1, -4, -7, -8 und Cluster 6, die auch unter Fichte vorkamen. Die unterschiedliche Zusammensetzung der methanotrophen Gemeinschaft in Böden unter Buche und Fichte spiegelt vermutlich die unterschiedlichen Monoterpenkonzentrationen in Laub- und Nadelwaldböden wieder (141).

Im Gegensatz hierzu konnten in sibirischen Laub- und Nadelwaldböden mittels Analyse methanotropher PLFAs in Kombination mit SIP (^{13}C -CH $_4$) keine Diversitätsunterschiede nachgewiesen werden (146). In allen untersuchten Waldbodentypen wurden nur zwei Fettsäuren mit dem schweren Isotop ^{13}C markiert: 18:1 ω 7 und 16:0. Beide PLFAs sind charakteristisch für

Beijerinckiaceae und werden in belüfteten Böden mit USC α in Verbindung gebracht. Im Vergleich zur PLFA-Analyse hat jedoch die in dieser Arbeit angewandte Untersuchung der *pmoA*-Gene eine weitaus höhere Auflösung, so dass Methanotrophe auf Gattungs- und sogar auf Artenebene identifiziert werden können. Mit Hilfe des 7%-„Cut-offs“ konnten innerhalb von USC α einzelne Spezies unterschieden werden. Die Anzahl dieser Spezies war unter Buche höher als unter Fichte (3.5.2.1).

Die hohe „Coverage“ der *pmoA*-Genbibliotheken deutet darauf hin, dass alle in den Böden relevanten Genotypen erfasst wurden. *pmoA*-Genfragmente weiterer bekannter atmosphärischer Methanoxidierer, wie beispielsweise *Methylocystis* oder Cluster 1 (122), oder des fakultativ methanotrophen Bakteriums *Methylocapsa aurea* (62) wurden in Solling, Steigerwald und Unterlüß nicht detektiert. Auch *mmoX*-Gene wurden nicht nachgewiesen. *Methylocella*-Spezies und andere Methanotrophe, die eine sMMO exprimieren, kommen in den untersuchten Waldböden entweder nicht vor oder nur in so geringen Zahlen, dass sie mit den verwendeten PCR-Assays nicht erfasst werden konnten. Methanotrophe *Verrucomicrobia* wurden erst kürzlich in sauren Habitaten entdeckt und isoliert (66, 102, 164). Da sich ihre *pmoA* stark von der bekannter Methanotropher unterscheidet und von den allgemein benutzten *pmoA*-Primern nicht erfasst wird, wurde postuliert, dass sie auch in weniger extremen Habitaten weit verbreitet sein könnten und bislang übersehen wurden. Mit neuen Primern, die die Gene *pmoA1* und *pmoA2* von methanotrophen *Verrucomicrobia* amplifizieren, konnten *Verrucomicrobia* in den untersuchten Waldböden nicht detektiert werden. Dies deutet darauf hin, dass sie keine Rolle bei der atmosphärischen Methanoxidation in den untersuchten Waldböden spielen.

Auch hinsichtlich der Biomasse atmosphärischer Methanoxidierer unterschieden sich Buchen- und Fichtenwaldböden. Die Abundanz von USC α war in Böden unter Buche jeweils leicht erhöht (3.5.3.2.2, Abbildung 17). Die mit dem neuen Assay Q-USC α ermittelten *pmoA*-Genzahlen waren höher als bereits publizierte, mit Assay FOREST bestimmte, Genzahlen (118, 123). Verglichen mit Q-USC α ist die *in silico* Erfassung verfügbarer *pmoA*-Sequenzen durch FOREST deutlich niedriger (Tabelle 24). Zusätzlich ermöglicht die Verwendung von INHIB-CORR zur Korrektur der Genzahlen um Inhibitionseffekte eine genauere Bestimmung der Genzahlen als durch Verdünnungsreihen. Die Bestimmung der *pmoA*-Genzahlen im Buchen- und Fichtenwaldboden vom Steigerwald mit beiden Assays bzw. Korrekturmethode ergab achtfach höhere Zahlen mit Q-USC α für identische DNA-Extrakte (Tabelle 24) und bestätigt somit die Unterschätzung der *pmoA*-Genzahlen mit Assay FOREST. Auch der ermittelte Anteil von USC α an der gesamten bakteriellen Gemeinschaft war in Böden unter Buche vier Mal höher als unter Fichte

(3.5.3.2.2) und erklärt die Unterschiede in der atmosphärischen Methanaufnahme von Buchen- und Fichtenwaldböden.

Mittels MPN-Analyse gelang es nicht, Methanotrophe aus Waldböden bei 50 ppm oder 1% Methan anzureichern. Bislang liegen keine Isolate oligotropher Methanotropher vor, die für die Oxidation atmosphärischen Methans in belüfteten Böden verantwortlich sind (USC α , USC γ , JR3, Cluster 1). Klassische Kultivierungsansätze führen meist zur Isolierung bereits bekannter, schnell wachsender methanotropher Spezies, die rasch auf *in situ* fremde Inkubationsbedingungen, z.B. erhöhte Methankonzentration, reagieren (5). Doch auch bei 1% Methan wurde auf klassischen Kultivierungsmedien für Methanotrophe nach vier Monaten keine Anreicherung verzeichnet (3.5.3.1). In Bodenaufschlammungen vom Steigerwald fand bei der gleichen Methankonzentration ebenfalls keine Methanoxidation statt (3.4). Trotz der hohen „Coverage“ der Genbibliotheken wurden keine *pmoA*-Sequenzen kultivierter Methanotropher detektiert (3.5.2.1). Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass kopiotrophe Methanotrophe, d.h. an hohe Methankonzentrationen adaptierte Methanotrophe, in den Waldböden Solling, Steigerwald und Unterlüß nicht vorkommen. Die Anreicherung und Isolierung atmosphärischer Methanoxidierer bedarf komplexerer Kultivierungsstrategien. Eine wichtige Rolle spielen hierbei vermutlich eine lange Inkubationsdauer, atmosphärische Methankonzentration sowie ein *in situ* naher pH-Wert und Salzgehalt.

Die mit Hilfe atmosphärischer Methanoxidationsraten und USC α -*pmoA*-Genzahlen berechneten Methanoxidationsraten pro USC α -Zelle waren in Buchen- höher als in entsprechenden Fichtenwaldböden. Die dominierende Baumart eines Waldes wirkt sich somit auf alle Aspekte der Struktur der methanotrophen Lebensgemeinschaft aus. Die verminderte Methanaufnahme in Fichtenwaldböden, die vermutlich durch den Einfluss fichtenspezifischer Monoterpene verursacht wird, spiegelt sich in der verminderten Diversität, Abundanz und zellspezifischen Aktivität atmosphärischer Methanoxidierer wieder (Hypothese 4, zutreffend).

4.4 Die ökologische Nische von USC α

Eine zellspezifische atmosphärische Methanoxidationsrate von mindestens 40×10^{-18} mol CH₄ Zelle⁻¹ h⁻¹ ist nötig, um das Überleben einer methanotrophen Zelle zu sichern (123). Dieser Schätzwert basiert auf der Annahme, dass die minimale Stoffwechselenergie bei 25°C pro Kohlenstoff-Mol 4,5 kJ h⁻¹ beträgt (202). Publierte zellspezifische atmosphärische

Methanoxidationsraten liegen bei $800 \times 10^{-18} \text{ mol CH}_4 \text{ Zelle}^{-1} \text{ h}^{-1}$ für USC α und $540 \times 10^{-18} \text{ mol CH}_4 \text{ Zelle}^{-1} \text{ h}^{-1}$ für Cluster 1 (123). Im Gegensatz dazu zeigten methanotrophe Reinkulturen Werte zwischen $0,2 \times 10^{-18}$ und $17 \times 10^{-18} \text{ mol CH}_4 \text{ Zelle}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (123). Dies unterstützte die Theorie, dass atmosphärische Methanoxidierer, entsprechend der K_M -Werte belüfteter Böden (13), eine hohe Affinität für Methan haben, und ließ schlussfolgern, dass diesen Organismen die Energie, die sie bei der Oxidation atmosphärischen Methans gewinnen, zum Überleben und Wachstum ausreicht (123). Wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt wurde, wurden die mit Assay FOREST (124) bestimmten *pmoA*-Genzahlen vermutlich unterschätzt, was zu einer Überschätzung der zellspezifischen Methanoxidationsraten führte (123). Im Rahmen dieser Arbeit wurden für USC α deutlich niedrigere zellspezifische Oxidationsraten zwischen 1×10^{-18} und $14 \times 10^{-18} \text{ mol CH}_4 \text{ Zelle}^{-1} \text{ h}^{-1}$ kalkuliert (Tabelle 25), die unter dem Minimalwert zur Aufrechterhaltung methanotropher Biomasse liegen. Dabei gilt jedoch zu berücksichtigen, dass die Berechnung dieser Raten auf DNA-Ebene erfolgte und somit die Annahme zu Grunde liegt, dass alle detektierten Gene aktive Zellen repräsentieren. Die zellspezifischen Methanoxidationsraten könnten somit leicht unterschätzt sein. Doch selbst, wenn nur die Hälfte der Zellen aktiv wäre, läge die zellspezifische Methanoxidationsrate noch unterhalb von $40 \times 10^{-18} \text{ mol CH}_4 \text{ Zelle}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (123).

Dadurch stellt sich die Frage, wie es USC α möglich ist, in belüfteten Böden, in denen auch unter anoxischen Bedingungen lange Zeit kein Methan gebildet wird (3.2.3, (55, 128) und die Methankonzentration sogar im subatmosphärischen Bereich liegt (2), zu überleben und zu wachsen. Es ist denkbar, dass USC α neben Methan im Boden verfügbare Mengen an Methanol verwertet, das beispielsweise beim Abbau von Pektin oder Lignin entsteht (85). *Methylocella silvestris* und *Methylocapsa aurea*, die aus einem Waldboden isoliert wurden, sind fakultativ methanotroph und können, alternativ zu Methan, auch Formiat, Acetat oder Ethanol als Kohlenstoffquelle nutzen (51, 62, 63). Dies lässt vermuten, dass USC α ebenfalls auf zusätzliche Kohlenstoffquellen angewiesen seinkönnte, um genug Energie für den Aufbau von Biomasse gewinnen zu können. Die Fähigkeit, alternative Kohlenstoffquellen nutzen zu können, würde auch den hohen Anteil von USC α an der bakteriellen Gemeinschaft erklären (bis zu 2%). Pflanzen geben organische Säuren, wie beispielsweise Acetat, als Wurzelexsudate in die Rhizosphäre ab (107), die potenziell von fakultativen Methanotrophen genutzt werden könnten. Die Inkubation von Rhizosphärenproben und Bodenproben ohne direkten Wurzeleinfluss lieferte jedoch keinen eindeutigen Hinweis auf eine erhöhte methanotrophe Aktivität in der Rhizosphäre (3.2.4).

4.5 Relevanz der verminderten Methanoxidation in Fichtenwaldböden

Bis zum 12. Jahrhundert waren 99% der deutschen Landesfläche mit Wald bedeckt. Dabei handelte es sich zu 81% um Laubwälder (163). Hauptsächlich Rotbuche (*Fagus silvatica* L.), aber auch Stieleiche (*Quercus robur* L.) und Traubeneiche (*Quercus petraea* (Matt.) Liebl) waren die vorherrschenden Baumarten. Ohne anthropogene Einflüsse und Eingriffe würden Laubhölzer auch heute noch die deutschen Wälder dominieren (163). Heute ist jedoch nur noch ein Drittel der deutschen Landesfläche mit Wäldern bedeckt. Fichte (*Picea abies* L.) und Kiefer (*Pinus sylvestris* L.) haben Buche und Eiche als dominierende Baumarten abgelöst (163). Zwischen dem 12. und 15. Jahrhundert kam es aufgrund wirtschaftlicher und bevölkerungspolitischer Notwendigkeiten zur Rodung und anschließenden Besiedlung großer Waldflächen (182). Die aufgelichteten und zerstörten Waldflächen begünstigten die natürliche Ausbreitung der anspruchslosen Fichte („spätmittelalterlicher Fichtenvorstoß“). Daneben wurden seit 1368 gelegentlich Nadelholzbestände angepflanzt (182). Im Zuge der Industriellen Revolution stieg der Holzbedarf stark an, und somit wuchs das Interesse an der Waldbewirtschaftung. Zerstörte Laubholzbestände und aufgelichtete Waldflächen wurden gezielt mit Nadelholz aufgeforstet, aufgrund des raschen Wachstums und der hohen Wirtschaftlichkeit vorwiegend mit Fichte (182), so dass viele Fichtenmonokulturen entstanden, die auch heute noch das Waldbild Deutschlands prägen.

Bodeninkubationen ergaben generell niedrigere Methanoxidationsraten in Fichten- als in Buchenwaldproben von Solling, Steigerwald und Unterlüß als Folge der verminderten Diversität, Abundanz und Aktivität Methanotropher. Das Methanoxidationspotenzial der untersuchten Fichtenwaldböden, ermittelt durch Michaelis-Menten-Kinetiken vom Steigerwald und Unterlüß, war gegenüber den Buchenwaldböden um 50 bis 65% vermindert (3.2.2.2). Vergleichbare Reduktionen wurden auch in anderen deutschen Wäldern ermittelt. Borken und Mitarbeiter beobachteten im Solling eine um 44 bzw. 63% verminderte Methansenkenstärke in Fichten- und Kiefernbeständen gegenüber Buchenbeständen (28). Im Lappwald war die Methanoxidation in einem Fichtenbestand um 86% niedriger als im benachbarten Laubmischwald (26). Im Höglwald war die Methansenkenstärke in Böden unter Fichte um 62% (33) und im Nussloch um 76% (30) niedriger als in buchendominierten Böden.

In der Vergangenheit wurde in Deutschland eine Fläche von $3,97 \times 10^6$ ha von natürlichem Laub- in Nadelwald umgewandelt (28). Bei einer mittleren Verminderung der Methansenkenstärke um 64% in Böden unter Fichte oder Kiefer ergibt sich eine Verringerung der Senkenstärke von

deutschen Waldböden um 31% durch Waldumbau (28). Diese Senkenminderung gewinnt gerade im Hinblick auf die aktuelle Diskussion um die globale Erwärmung an Bedeutung, da Waldböden die effektivste terrestrische Senke für atmosphärisches Methan darstellen (46, 190). Waldumbaumaßnahmen waren nicht nur auf Deutschland beschränkt; sie fanden in ganz Mitteleuropa statt, so z.B. in der Schweiz oder in Österreich (182). Die Rückwandlung von Fichtenmonokulturen in artenreiche Mischwälder, in denen die ursprüngliche natürliche Baumart (in Deutschland meist die Rotbuche) dominiert, sollte langfristig zu einer Erhöhung der Senkenstärke von Waldböden für atmosphärisches Methan führen.

4.6 Modell: Atmosphärische Methanoxidation in Buchen- und Fichtenwaldböden durch unkultivierte Methanotrophe

Basierend auf den Ergebnissen dieser Arbeit und denen von Maurer *et al.*, 2008, eine dieser Arbeit angegliederte Studie, kann ein Modell der atmosphärischen Methanoxidation in Buchen- und Fichtenwaldböden erstellt werden (Abbildung 18). Die vorgestellten Daten unterstützen die unter 1.6 aufgestellten Hypothesen nur zum Teil. Die Methanoxidation in Buchenwaldböden ist zwei- bis dreimal höher als in Böden unter Fichte. Der Einfluss der Baumart wirkt sich auch auf die Struktur der methanotrophen Lebensgemeinschaft aus. Beide Bodentypen werden von USC α dominiert. Auf Artenlevel ist die Diversität Methanotropher in Buchenwaldböden jedoch höher als in Fichtenwaldböden. Unter Buche traten neun verschiedene Genotypen auf, während unter Fichte nur fünf Genotypen zu finden waren. Auch die Abundanz von USC α ist höher in Böden unter Fichte.

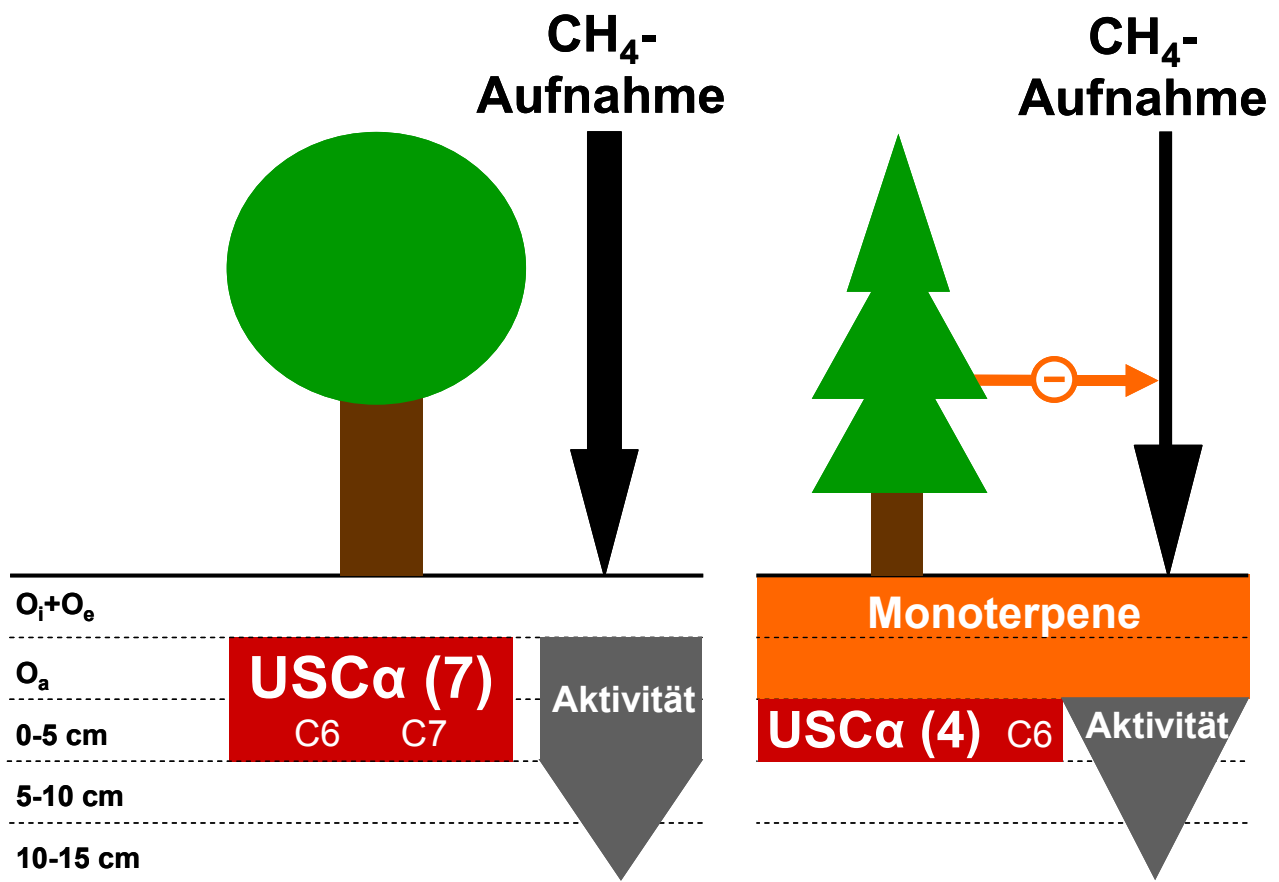


Abbildung 18: Modell der atmosphärischen Methanoxidation in Buchen- und Fichtenwäldböden. Dargestellt sind das unterschiedliche Methanoxidationspotenzial beider Bodentypen, die Inhibition der Methanoxidation in Fichtenwäldböden durch Monoterpene, die Lokalisierung der methanotropen Aktivität im Boden und die beteiligten Methanotrophen. Die relative Größe der Methanoxidationsraten ist durch die Stärke der Pfeile angedeutet. Die inhibitorische Wirkung der Monoterpene ist durch das Minus dargestellt. Die Abundanz der Methanotrophen ist durch die Schriftgröße angedeutet. USCα, Upland Soil Cluster alpha; C6, Cluster 6; C7, Cluster 7.

Es ist unwahrscheinlich, dass die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Umweltfaktoren, d.h. Gasdiffusion durch die organische Auflage, pH-Wert, Ammoniumkonzentration und Ethylenproduktion, Ursache für die unterschiedlichen Methanoxidationsraten sind. Stattdessen wird die Methanoxidation in Böden unter Fichte durch die in Fichtennadeln und -wurzeln enthaltenen Monoterpene inhibiert (141). Monoterpene sind vermutlich auch der Grund für das fehlende Methanoxidationspotenzial des O_a-Horizonts unter Fichte. Die methanotrophe Aktivität ist hier im oberen Mineralboden (0-5 cm) lokalisiert. Unter Buche findet sich die maximale methanotrophe Aktivität im O_a-Horizont und oberen Mineralboden (0-5 cm). Neben Monoterpenen sorgen vermutlich weitere inhibitorische Verbindungen für das Fehlen der Methanoxidation im O_i

und O_e-Horizont auch unter Buche. Der Einfluss von Baumwurzeln auf die Methanoxidation und die Wirkung von β -Pinen auf die Expression der pMMO konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden. Zusammenfassend kann geschlussfolgert werden, dass die von Fichten produzierten Monoterpene die Aktivität, Diversität und Abundanz methanotropher Bakterien verringern.

4.7 Ausblick

Ziel dieser Arbeit war es, das grundsätzliche Verständnis der Regulation der atmosphärischen Methanoxidation in Laub- und Nadelwaldböden und der beteiligten methanotrophen Populationen zu vertiefen. Die Ergebnisse dieser Arbeit weisen deutlich darauf hin, dass die von Nadelgehölzen, in diesem Fall der Gemeinen Fichte (*Picea abies* L.), produzierten Monoterpene (141) die Aktivität, Diversität und Abundanz Methanotropher verringern und so auch die Methanoxidation gegenüber Laubwaldböden reduzieren.

Der Inhibitionsmechanismus von Monoterpenen auf die Methanoxidation ist auf zellulärer Ebene bislang ungeklärt. Dessen Aufklärung würde zum Verständnis der Regulation der atmosphärischen Methanoxidation in Waldböden beitragen. Da sowohl die sMMO als auch die pMMO inzwischen aufgereinigt und charakterisiert wurden, könnte mit Studien an diesen Enzymen der Wirkungsmechanismus von Monoterpenen geklärt werden. Außerdem ist es nötig, das Vorkommen und die Verteilung von Monoterpenen in Waldböden näher zu untersuchen. Die separate Analyse der Monoterpenkonzentration in den einzelnen Horizonten der organischen Auflage (O_i, O_e, O_a) würde den Nachweis bringen, ob Monoterpene im O_a-Horizont so stark konzentriert sind, dass sie die Methanoxidation in diesem Horizont inhibieren können. Auch die mögliche Abgabe von Monoterpenen in tiefere Bodenschichten über die Baumwurzeln ist ein interessanter Aspekt, der direkt vor Ort über Beprobung der Rhizosphäre verschiedener Wurzeltypen im Mineralboden (z.B. Feinwurzeln versus verholzte Wurzeln) und anschließende Bestimmung der Monoterpenkonzentration näher analysiert werden könnte.

Die zellspezifische Aktivität von USC α sowie dessen hoher Anteil an der bakteriellen Gemeinschaft werfen die Frage auf, ob es sich bei USC α um fakultative Methanotrophe handelt. Die sicherste Möglichkeit, diese Frage zu beantworten, wäre die Charakterisierung eines USC α -Isolats bezüglich Substratspektrum und Wachstum bei verschiedenen, gleichzeitig dargebotenen Kohlenstoffquellen (z.B. Methan und Acetat). Bislang ist es jedoch nicht gelungen, USC α zu

isolieren. Fakultativ methanotrophe Spezies der Gattung *Methylocella* bevorzugen Acetat, wenn ihnen Methan und Acetat gleichzeitig angeboten werden. Nachdem Acetat vollständig verbraucht ist, nehmen sie die Methanoxidation wieder auf (51). Auch die kürzlich isolierte Spezies *Methylocapsa aurea* ist in der Lage, Formiat und Acetat zu verwerten (62). Dieses Wissen könnte genutzt werden, um, in Ermangelung eines USC α -Isolats, zumindest einen indirekten Hinweis auf die Physiologie von USC α zu erlangen. Wird einer Waldbodenprobe während der exponentiellen Oxidation von Methan Acetat zugefügt, sollte dies, im Fall der fakultativen Methanotrophie von USC α , die Methanoxidation stoppen. Als Methankonzentration könnten 50 bis 100 ppm Methan genutzt werden (siehe Michaelis-Menten-Kinetiken), um die Inkubationsdauer zu erhöhen, da atmosphärisches Methan innerhalb weniger Stunden vollständig abgebaut ist. Eine weitere Möglichkeit wäre die Anwendung von DNA-SIP mit ^{13}C -markiertem Acetat als Substrat. Fakultativ Methanotrophe assimilieren das schwere Kohlenstoffisotop. Durch anschließende T-RFLP-Analyse (terminal restriction fragment length polymorphism, terminaler Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus) und die Erstellung von *pmoA*-Genbibliotheken könnten die *pmoA*-Genfragmente analysiert werden und fakultativ Methanotrophe anhand der schweren ^{13}C -markierten *pmoA* identifiziert werden. Jeder weitere Hinweis auf die Physiologie von USC α ist ein wichtiger Schritt für das Verständnis der atmosphärischen Methanoxidation in belüfteten Böden.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Die mikrobielle Oxidation atmosphärischen Methans ist in Nadelwaldböden bis zu drei Mal niedriger als in Laubwaldböden. Ziel dieser Dissertation war es, anhand von drei deutschen Waldstandorten (Solling, Steigerwald und Unterlüß) mit jeweils benachbarten Beständen der Rotbuche (*Fagus sylvatica* L.) und der Gemeinen Fichte (*Picea abies* L.), die Umweltparameter zu identifizieren, die diese unterschiedlichen Methanoxidationsraten hervorrufen, und deren Auswirkungen auf die Diversität und Abundanz der methanotrophen Lebensgemeinschaft zu bestimmen.

Die Aufnahme von Michaelis-Menten-Kinetiken an intakten Bodenkernen bei konstanter Methankonzentration, Temperatur sowie konstantem Matrixpotenzial ergab, dass die kinetischen Parameter $V_{\max(\text{app})}$ und $K_{M(\text{app})}$ in Fichtenwaldböden bis zu 65% niedriger waren als in entsprechenden Buchenwaldböden. *In situ* Methanaufnahmeraten und atmosphärische Methanoxidationsraten gestörter Bodenproben waren in Böden unter Fichte ebenfalls niedriger. Die maximale methanotrophe Aktivität war im O_a -Horizont (Buche) oder in den ersten fünf Zentimetern des Mineralbodens lokalisiert. Unter Fichte wurde im O_a -Horizont keine Methanoxidation detektiert. Im O_i - und O_e -Horizont wurde in keinem der beiden Waldbodentypen methanotrophe Aktivität verzeichnet.

Die Gasdiffusion durch die organische Auflage der Böden, der pH-Wert und die Ammoniumkonzentration waren in beiden Waldbodentypen ähnlich und schieden somit als regulierende Faktoren für die atmosphärische Methanoxidation in Laub- und Nadelwaldböden aus. Die Produktion von Ethylen unter oxischen Bedingungen war vernachlässigbar, so dass Ethylen ebenfalls ausgeschlossen werden konnte. β -Pinen, welches in Fichtennadeln und -wurzeln vorkommt und eine sehr hohe inhibitorische Wirkung auf die Methanoxidation zeigt, inhibierte die Oxidation von Methan in Bodenaufschlammungen des Steigerwalds vollständig bei einer Konzentration, die dem Fünffachen der *in situ* Konzentration entsprach. Die von Fichten freigesetzten Monoterpene können die verminderte Methanaufnahme in Fichtenwaldböden erklären.

Der Einfluss der Baumart auf die Zusammensetzung der methanotrophen Lebensgemeinschaft wurde durch vergleichende Analyse der Gene der partikulären Methanmonooxygenase (*pmoA*) untersucht. Von den insgesamt 366 analysierten *pmoA*-Genen

waren 82% Upland Soil Cluster alpha (USC α) zuzuordnen, dem global am häufigsten detektierten *pmoA*-Genotyp in Waldböden. Durch Vergleich der PmoA-Sequenzen mit den entsprechenden 16S rRNA-Gensequenzen bekannter methanotropher Isolate wurde ein distanzbasierter „Cut-off“ von 7% auf Proteinebene zur Differenzierung methanotropher OTUs auf Artenebene kalkuliert. Unter Anwendung dieses „Cut-offs“ konnten in Buchenwaldböden sieben OTUs innerhalb von USC α unterschieden werden. Außerdem wurden zwei tiefabzweigende Genotypen (Cluster 6 und Cluster 7) detektiert, die nur entfernt verwandt zu bekannten PmoA-/AmoA-Sequenzen waren. In Fichtenwaldböden waren dagegen nur vier USC α -OTUs sowie Cluster 6 detektierbar. Die erniedrigte Diversität Methanotropher in Fichtenwaldböden wurde durch statistische Analysen bestätigt. Genfragmente von *mmoX* und der *pmoA* von methanotrophen *Verrucomicrobia* wurden nicht detektiert. *amoA*-Gene mit hoher Verwandtschaft zur *amoA* von *Nitrosospora briensis* wurden gelegentlich kodetektiert.

Die Abundanz der *pmoA*-Gene von USC α , der Anteil von USC α an der bakteriellen Gemeinschaft sowie die zellspezifische Aktivität von USC α waren in Böden unter Fichte niedriger als unter Buche. Die ermittelten Werte für die zellspezifische Aktivität von USC α lagen unterhalb des theoretischen Mindestwerts, der für das Überleben einer methanotrophen Zelle bei Oxidation von atmosphärischem Methan notwendig ist. Dies lässt vermuten, dass USC α neben atmosphärischem Methan auf alternative Kohlenstoff- und Energiequellen angewiesen sein könnte.

Zusammenfassend lassen die Ergebnisse dieser Disseration den Schluss zu, dass von Fichten freigesetzte Monoterpene die Aktivität, Diversität und Abundanz atmosphärischer Methanoxidierer reduzieren und so die atmosphärische Methanaufnahme von Fichtenwaldböden verringern.

6 SUMMARY

The microbial oxidation of atmospheric methane is up to three times greater in coniferous forests than in deciduous forests. The objective of this dissertation was to resolve the environmental factors causing these different methane oxidation rates and determine their effect on the methanotrophic diversity and abundance. Adjacent European beech (*Fagus sylvatica* L.) and Norway spruce (*Picea abies* L.) stands from three German forest sites (Solling, Steigerwald, and Unterlüß) were analysed.

Michaelis Menten kinetics of intact soil cores determined at constant methane concentration, temperature, and matric potential revealed that kinetic parameters $V_{\max(\text{app})}$ and $K_{\text{M}(\text{app})}$ were 65% lower in spruce soils than in corresponding beech soils. *In situ* methane consumption rates and atmospheric methane oxidation rates revealed from homogenized soils samples were lower in soils under spruce, too. Maximum methanotrophic activity was located in the O_a horizon (beech) or the upper 5 cm of the mineral soil. No methane oxidation was detected in the O_a horizon of spruce soils or in O_i and O_e horizon of both forest soil types.

Diffusive flux through the organic layer, pH, and ammonium concentration were similar for both forest types and could be excluded as governing factors of atmospheric methane oxidation in deciduous and coniferous forest soils. Ethylene production was negligible under oxic conditions and thus, could also be excluded. β -pinene, which occurs in spruce needles and roots and has a great inhibitory effect on methane oxidation, completely inhibited methane oxidation in soil slurries from Steigerwald at a concentration, which was five times the *in situ* concentration. Spruce-derived monoterpenes may explain the reduced methane consumption in spruce soils.

The effect of tree species on methanotrophic community composition was assessed by comparative analysis of particulate methane monooxygenase genes (*pmoA*). 82% of 366 analyzed *pmoA* genes affiliated with upland soil cluster alpha (USC α), the most frequently detected *pmoA* genotype in forest soils worldwide. A distance cut-off of 7% on protein level was calculated for methanotrophic species-level OTUs based on the comparison of PmoA and corresponding 16S rRNA gene sequences of known methanotrophic isolates. Applying this cut-off, seven OTUs could be differentiated within USC α in beech soils. Additionally, two deep branching genotypes (cluster 6 and cluster 7) were detected that were only distantly related to known PmoA or AmoA sequences. In contrast, only four USC α OTUs and cluster 6 were detected in spruce soils. The lower diversity

of methanotrophs in spruce soils was supported by statistical approaches. *mmoX* genes and *pmoA* genes of methanotrophic *Verrucomicrobia* were not detected. *amoA* genes highly similar to *amoA* of *Nitrosospira briensis* were occasionally codetected.

Abundance of USC α *pmoA* genes, proportion of USC α to total bacterial community and cell-specific activity of USC α were lower in soils under spruce than under beech. Calculated cell-specific methane oxidation rates of USC α were below the theoretical threshold necessary for facilitating cell maintenance suggesting that USC α might rely on alternative carbon and energy sources other than methane.

The collective results of this dissertation indicate that spruce-derived monoterpenes reduce the activity, diversity, and abundance of atmospheric methane oxidizers, and thus, reduce the capacity of spruce soils to consume atmospheric methane.

7 LITERATURVERZEICHNIS

1. **Aaij, C., and P. Borst.** 1972. The gel electrophoresis of DNA. *Biochim. Biophys. Acta* **269**:192-200.
2. **Adamsen, A. P., and G. M. King.** 1993. Methane consumption in temperate and sub-arctic forest soils - rates, vertical zonation, and responses to water and nitrogen. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**:485-490.
3. **Amaral, J. A., A. Ekins, S. R. Richards, and R. Knowles.** 1998. Effect of selected monoterpenes on methane oxidation, denitrification, and aerobic metabolism by bacteria in pure culture. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:520-525.
4. **Amaral, J. A., and R. Knowles.** 1998. Inhibition of methane consumption in forest soils by monoterpenes. *J. Chem. Ecol.* **24**:723-734.
5. **Amaral, J. A., T. Ren, and R. Knowles.** 1998. Atmospheric methane consumption by forest soils and extracted bacteria at different pH values. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:2397-2402.
6. **Andrews, R. E., L. W. Parks, and K. D. Spence.** 1980. Some effects of Douglas-fir terpenes on certain microorganisms. *Appl. Environ. Microbiol.* **40**:301-304.
7. **Augusto, L., J. Ranger, D. Binkley, and A. Rothe.** 2002. Impact of several common tree species of European temperate forest on soil fertility. *Ann. For. Sci.* **59**:233-255.
8. **Baani, M., and W. Liesack.** 2008. Two isozymes of particulate methane monooxygenase with different methane oxidation kinetics are found in *Methylocystis* sp. strain SC2. *PNAS* **105**:10203-10208.
9. **Ball, B. C., K. A. Smith, L. Klemetsson, R. Brumme, B. K. Sitaula, S. Hansen, A. Priemé, J. Macdonald, and G. W. Horgan.** 1997. The influence of soil gas transport properties on methane oxidation in a selection of northern European soils. *J. Geophys. Res.* **102**:23.309-23.317.

10. **Baxter, N. J., R. P. Hirt, L. Bodrossy, K. L. Kovacs, T. M. Embley, J. I. Prosser, and J. C. Murrell.** 2002. The ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase gene cluster of *Methylococcus capsulatus* (Bath). Arch. Microbiol. **177**:279-289.
11. **Beal, E. J., C. H. House, and V. J. Orphan.** 2009. Manganese- and iron-dependent marine methane oxidation. Science **325**:184-187.
12. **Bédard, C., and R. Knowles.** 1989. Physiology, biochemistry, and specific inhibitors of CH₄, NH₄⁺, and CO oxidation by methanotrophs and nitrifiers. Microbiol. Rev. **53**:68-84.
13. **Bender, M., and R. Conrad.** 1992. Kinetics of CH₄ oxidation in oxic soils exposed to ambient air or high CH₄ mixing ratios. FEMS Microbiol. Ecol. **101**:261-270.
14. **Bender, M., and R. Conrad.** 1993. Kinetics of methane oxidation in oxic soils. Chemosphere **26**:687-696.
15. **Bender, M., and R. Conrad.** 1994. Methane oxidation activity in various soils and fresh-water sediments - occurrence, characteristics, vertical profiles, and distribution on grain-size fractions. J. Geophys. Res. **99**:16531-16540.
16. **Bengtson, P., N. Basiliko, M. G. Dumont, M. Hills, J. C. Murrell, R. Roy, and S. J. Grayston.** 2009. Links between methanotroph community composition and CH₄ oxidation in a pine forest soil. FEMS Microbiol. Ecol. **70**:356-366.
17. **Benson, D. A., I. K. Karsch-Mizrachi, D. J. Lipman, J. Ostell, and D. L. Wheeler.** 2008. GenBank. Nucleic Acids Res. **36**:D25-D30.
18. **Blachnik, R.** 1998. D'Ans Lax Taschenbuch für Chemiker und Physiker, 4th ed., vol. 3. Springer, Berlin, Heidelberg.
19. **Blume, H. P., G. W. Brümmer, R. Horn, E. Kandeler, I. Kögel-Knabner, R. Kretzschmar, K. Stahr, and B. M. Wilke.** 2010. Scheffer/Schachtschabel. Lehrbuch der Bodenkunde, 16th ed. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
20. **Bodelier, P. L. E., and H. J. Laanbroek.** 2004. Nitrogen as a regulatory factor of methane oxidation in soils and sediments. FEMS Microbiol. Ecol. **47**:265-277.

21. **Bodelier, P. L., and P. Frenzel.** 1999. Contribution of methanotrophic and nitrifying bacteria to CH₄ and NH₄⁺ oxidation in the rhizosphere of rice plants as determined by new methods of discrimination. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:1826-1833.
22. **Bodrossy, L., E. M. Holmes, A. J. Holmes, K. L. Kovacs, and J. C. Murrell.** 1997. Analysis of 16S rRNA and methane monooxygenase gene sequences reveals a novel group of thermotolerant and thermophilic methanotrophs, *Methylocaldum* gen. nov. *Arch. Microbiol.* **168**:493-503.
23. **Boetius, A., K. Ravensschlag, C. J. Schubert, D. Rickert, F. Widdel, A. Giesecke, R. Amann, B. B. Jorgensen, U. Witte, and O. Pfannkuche.** 2000. A marine microbial consortium apparently mediating anaerobic oxidation of methane. *Nature* **407**:623-626.
24. **Borken, W., and F. Beese.** 2006. Methane and nitrous oxide fluxes of soils in pure and mixed stands of European beech and Norway spruce. *Eur. J. Soil Sci.* **57**:617-625.
25. **Borken, W., F. Beese, R. Brumme, and N. Lamersdorf.** 2002. Long-term reduction in nitrogen and proton inputs did not affect atmospheric methane uptake and nitrous oxide emission from a German spruce forest soil. *Soil Biol. Biochem.* **34**:1815-1819.
26. **Borken, W., and R. Brumme.** 1997. Liming practice in temperate forest ecosystems and the effects on CO₂, N₂O and CH₄ fluxes. *Soil Use Manage.* **13**:251-257.
27. **Borken, W., E. A. Davidson, K. Savage, E. T. Sundquist, and P. Steudler.** 2006. Effect of summer throughfall exclusion, summer drought, and winter snow cover on methane fluxes in a temperate forest soil. *Soil Biol. Biochem.* **38**:1388-1395.
28. **Borken, W., Y. J. Xu, and F. Beese.** 2003. Conversion of hardwood forests to spruce and pine plantations strongly reduced soil methane sink in Germany. *Glob. Change Biol.* **9**:956-966.
29. **Borken, W., Y. J. Xu, and F. Beese.** 2004. Ammonium, nitrate and dissolved organic nitrogen in seepage water as affected by compost amendment to European beech, Norway spruce, and Scots pine forests. *Plant Soil* **258**:121-134.
30. **Born, M., H. Dörr, and I. Levin.** 1990. Methane consumption in aerated soils of the temperate zone. *Tellus* **42B**:2-8.

-
31. **Bradford, M. A., P. A. Wookey, P. Ineson, and H. M. Lappin-Scott.** 2001. Controlling factors and effects of chronic nitrogen and sulphur deposition on methane oxidation in a temperate forest soil. *Soil Biol. Biochem.* **33**:93-102.
 32. **Bustin, S. A., V. Benes, J. A. Garson, J. Hellemans, J. Huggett, M. Kubista, R. Mueller, T. Nolan, M. W. Pfaffl, G. L. Shipley, J. Vandesompele, and C. T. Wittwer.** 2009. The MIQE Guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin. Chem.* **55**:611-622.
 33. **Butterbach-Bahl, K., and H. Papen.** 2002. Four years continuous record of CH₄-exchange between the atmosphere and untreated and limed soil of a N-saturated spruce and beech forest ecosystem in Germany. *Plant Soil* **240**:77-90.
 34. **Carlsen, H. N., L. Joergensen, and H. Degn.** 1991. Inhibition by ammonia of methane utilization in *Methylococcus capsulatus* (Bath). *Appl. Microbiol. Biotech.* **35**:124-127.
 35. **Chao, A.** 1984. Non-parametric estimation of the number of classes in a population. *Scand. J. Stat.* **11**:265-270.
 36. **Chen, Y., M. G. Dumont, N. P. McNamara, P. M. Chamberlain, L. Bodrossy, N. Stralis-Pavese, and J. C. Murrell.** 2008. Diversity of the active methanotrophic community in acidic peatlands as assessed by mRNA and SIP-PLFA analyses. *Environ. Microbiol.* **10**:446-459.
 37. **Cicerone, R. J., and R. S. Oremland.** 1988. Biogeochemical aspects of atmospheric methane. *Glob. Biogeochem. Cycles* **2**:299-327.
 38. **Čikoš, Š., and J. Koppel.** 2009. Transformation of real-time PCR fluorescence data to target gene quantity. *Anal. Biochem.* **384**:1-10.
 39. **Conrad, R.** 1996. Soil microorganisms as controllers of atmospheric trace gases (H₂, CO, CH₄, OCS, N₂O, and NO). *Microbiol. Rev.* **60**:609-640.
 40. **Conrad, R.** 2007. Microbial ecology of methanogens and methanotrophs. *Adv. Agron.* **96**:1-63.
 41. **Conrad, R.** 2009. The global methane cycle: recent advances in understanding the microbial processes involved. *Environ. Microbiol. Rep.* **1**:285-292.

42. **Corre, M. D., F. O. Beese, and R. Brumme.** 2003. Soil nitrogen cycle in high nitrogen deposition forest: changes under nitrogen saturation and liming. *Ecol. Appl.* **13**:287-298.
43. **Costello, A. M., A. J. Auman, J. L. Macalady, K. M. Scow, and M. E. Lidstrom.** 2002. Estimation of methanotroph abundance in a freshwater lake sediment. *Environ. Microbiol.* **4**:443-450.
44. **Crowther, G. J., G. Kosaly, and M. E. Lidstrom.** 2008. Formate as the main branch point for methylotrophic metabolism in *Methylobacterium extorquens* AM1. *J. Bacteriol.* **190**:5057-5062.
45. **Czepiel, P. M., P. M. Crill, and R. C. Harriss.** 1995. Environmental factors influencing the variability of methane oxidation in temperate zone soils. *J. Geophys. Res.* **100**:9359-9364.
46. **Dalal, R. C., and D. E. Allen.** 2008. Greenhouse gas fluxes from natural ecosystems. *Aust. J. Bot.* **56**:369-407.
47. **De Man, J. C.** 1975. The probability of most probable numbers. *Eur. J. Appl. Microbiol.* **1**:67-78.
48. **Dedysh, S. N., S. E. Belova, P. L. Bodelier, K. V. Smirnova, V. N. Khmelenina, A. Chidthaisong, Y. A. Trotsenko, W. Liesack, and P. F. Dunfield.** 2007. *Methylocystis heyeri* sp. nov., a novel type II methanotrophic bacterium possessing 'signature' fatty acids of type I methanotrophs. *Int. J. Syst. Evol. Micr.* **57**:472-479.
49. **Dedysh, S. N., Y. Y. Berestovskaya, L. V. Vasylieva, S. E. Belova, V. N. Khmelenina, N. E. Suzina, Y. A. Trotsenko, W. Liesack, and G. A. Zavarzin.** 2004. *Methylocella tundrae* sp. nov., a novel methanotrophic bacterium from acidic tundra peatlands. *Int. J. Syst. Evol. Micr.* **54**:151-156.
50. **Dedysh, S. N., V. N. Khmelenina, N. E. Suzina, Y. A. Trotsenko, J. D. Semrau, W. Liesack, and J. M. Tiedje.** 2002. *Methylocapsa acidiphila* gen. nov., sp. nov., a novel methane-oxidizing and dinitrogen-fixing acidophilic bacterium from Sphagnum bog. *Int. J. Syst. Evol. Micr.* **52**:251-261.
51. **Dedysh, S. N., C. Knief, and P. F. Dunfield.** 2005. *Methylocella* species are facultatively methanotrophic. *J. Bacteriol.* **187**:4665-4670.

-
52. **Dedysh, S. N., W. Liesack, V. N. Khmelenina, N. E. Suzina, Y. A. Trotsenko, J. D. Semrau, A. M. Bares, N. S. Panikov, and J. M. Tiedje.** 2000. *Methylocella palustris* gen. nov., sp nov., a new methane-oxidizing acidophilic bacterium from peat bogs, representing a novel subtype of serine-pathway methanotrophs. *Int. J. Syst. Evol. Micro.* **50**:955-969.
53. **Dedysh, S. N., N. S. Panikov, W. Liesack, R. Grosskopf, J. Z. Zhou, and J. M. Tiedje.** 1998. Isolation of acidophilic methane-oxidizing bacteria from northern peat wetlands. *Science* **282**:281-284.
54. **Dedysh, S. N., N. S. Panikov, and J. M. Tiedje.** 1998. Acidophilic methanotrophic communities from *Sphagnum* peat bogs. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:922-929.
55. **Degelmann, D. M., S. Kolb, M. Dumont, J. C. Murrell, and H. L. Drake.** 2009. *Enterobacteriaceae* facilitate the anaerobic degradation of glucose by a forest soil. *FEMS Microbiol. Ecol.* **68**:312-319.
56. **Denman, K. L., G. Brasseur, A. Chidthaisong, P. Ciais, P. M. Cox, R. E. Dickinson, D. Hauglustaine, C. Heinze, E. Holland, D. Jacob, U. Lohmann, S. Ramachandran, P. L. da Silva Dias, S. C. Wofsy, and X. Zhang.** 2007. Couplings between changes in the climate system and biogeochemistry. In S. Solomon, D. Qin, M. Manning, Z. Chen, M. Marquis, K. B. Averyt, M. Tignor, and H. L. Miller. *Climate Change 2007, The physical science basis. Contribution of working group I to the fourth assessment report of the intergovernmental panel on climate change.* Cambridge University Press, Cambridge, UK and NY, USA.
57. **Dev, S., A. P. S. Narula, and J. S. Yadav.** 1982. *Handbook of Terpenoids - Monoterpenoids*, 2nd ed. C.R.C. Press, Florida, USA.
58. **Dobbie, K. E., and K. A. Smith.** 1996. Comparison of CH₄ oxidation rates in woodland, arable and set aside soils. *Soil Biol. Biochem.* **28**:1357-1365.
59. **Dobbie, K. E., K. A. Smith, A. Prieme, S. Christensen, A. Degorska, and P. Orlanski.** 1996. Effect of land use on the rate of methane uptake by surface soils in northern Europe. *Atmos. Environ.* **30**:1005-1011.

60. **Dong, Y., D. Scharffe, J. M. Lobert, P. J. Crutzen, and E. Sanhueza.** 1998. Fluxes of CO₂, CH₄ and N₂O from a temperate forest soil: the effects of leaves and humus layers. *Tellus* **50B**:243-252.
61. **Dunfield, P., and R. Knowles.** 1995. Kinetics of inhibition of methane oxidation by nitrate, nitrite, and ammonium in a humisol. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**:3129-3135.
62. **Dunfield, P. F., S. E. Belova, A. V. Vorob'ev, S. L. Cornish, and S. N. Dedysh.** 2010. *Methylocapsa aurea* sp. nov., a facultatively methanotrophic bacterium possessing a particulate methane monooxygenase. *Int. J. Syst. Evol. Micr.*:DOI 10.1099/ijs.0.020149-0.
63. **Dunfield, P. F., V. N. Khmelenina, N. E. Suzina, Y. A. Trotsenko, and S. N. Dedysh.** 2003. *Methylocella silvestris* sp. nov., a novel methanotroph isolated from an acidic forest cambisol. *Int. J. Syst. Evol. Micr.* **53**:1231-1239.
64. **Dunfield, P. F., W. Liesack, T. Henckel, R. Knowles, and R. Conrad.** 1999. High-affinity methane oxidation by a soil enrichment culture containing a type II methanotroph. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:1009-1014.
65. **Dunfield, P. F., M. T. Yimga, S. N. Dedysh, U. Berger, W. Liesack, and J. Heyer.** 2002. Isolation of a *Methylocystis* strain containing a novel *pmoA*-like gene. *FEMS Microbiol. Ecol.* **41**:17-26.
66. **Dunfield, P. F., A. Yuryev, P. Senin, A. V. Smirnova, M. B. Stott, S. Hou, B. Ly, J. H. Saw, Z. Zhou, Y. Ren, J. Wang, B. W. Mountain, M. A. Crowe, T. M. Weatherby, P. L. E. Bodelier, W. Liesack, L. Feng, L. Wang, and M. Alam.** 2007. Methane oxidation by an extremely acidophilic bacterium of the phylum *Verrucomicrobia*. *Nature* **450**:879-882.
67. **Ellerbrock, R. H., H. H. Gerke, J. Bachmann, and M. O. Goebel.** 2005. Composition of organic matter fractions for explaining wettability of three forest soils. *Soil Sci. Soc. Am. J.* **69**:57-66.
68. **Etiope, G., and R. W. Klusman.** 2002. Geologic emissions of methane to the atmosphere. *Chemosphere* **49**:777-789.
69. **Ettwig, K. F., S. Shima, K. T. van de Pas-Schoonen, J. Kahnt, M. H. Medema, H. J. op den Camp, M. S. Jetten, and M. Strous.** 2008. Denitrifying bacteria anaerobically oxidize methane in the absence of *Archaea*. *Environ. Microbiol.* **10**:3164-3173.

-
70. **Ettwig, K. F., T. van Alen, K. T. van de Pas-Schoonen, M. S. Jetten, and M. Strous.** 2009. Enrichment and molecular detection of denitrifying methanotrophic bacteria of the NC10 phylum. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**:3656-3662.
71. **Felsenstein, J.** 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* **39**:783-791.
72. **Forster, P., V. Ramaswamy, P. Artaxo, T. Berntsen, R. Betts, D. W. Fahey, J. Haywood, J. Lean, D. C. Lowe, G. Myhre, J. Nganga, R. Prinn, G. Raga, M. Schulz, and R. Van Dorland.** 2007. Changes in atmospheric constituents and in radiative forcing. *In* S. Solomon, D. Qin, M. Manning, Z. Chen, M. Marquis, K. B. Averyt, M. Tignor, and H. L. Miller. *Climate Change 2007, The physical science basis. Contribution of working group I to the fourth assessment report of the intergovernmental panel on climate change.* Cambridge University Press, Cambridge, UK and NY, USA.
73. **Frenzel, P., B. Thebrath, and R. Conrad.** 1990. Oxidation of methane in the oxic surface layer of a deep lake sediment (Lake Constance). *FEMS Microbiol. Lett.* **73**:149-158.
74. **Fukuda, H., T. Ogawa, and S. Tanase.** 1993. Ethylene production by micro-organisms. *In* A. H. Rose. *Advances in microbial physiology*, vol. 35. Academic press, London, UK.
75. **Geron, C., R. Rasmussen, R. R. Arnts, and A. Guenther.** 2000. A review and synthesis of monoterpene speciation from forests in the United States. *Atmos. Environ.* **34**:1761-1781.
76. **Goldman, M. B., P. M. Groffman, R. V. Pouyat, M. J. McDonnell, and S. T. A. Pickett.** 1995. CH₄ uptake and N availability in forest soils along an urban to rural gradient. *Soil Biol. Biochem.* **27**:281-286.
77. **Gotelli, N. J., and R. K. Colwell.** 2001. Quantifying biodiversity: procedures and pitfalls in the measurement and comparison of species richness. *Ecol. Lett.* **4**:379-391.
78. **Griffiths, R. I., A. S. Whiteley, A. G. O'Donnell, and M. J. Bailey.** 2000. Rapid method for coextraction of DNA and RNA from natural environments for analysis of ribosomal DNA- and rRNA-based microbial community composition. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**:5488-5491.

- 79. **Guckland, A., H. Flessa, and J. Prenzel.** 2009. Controls of temporal and spatial variability of methane uptake in soils of a temperate deciduous forest with different abundance of European beech (*Fagus sylvatica* L.). *Soil Biol. Biochem.* **41**:1659-1667.
- 80. **Gulledge, J., Y. Hrywna, C. Cavanaugh, and P. A. Steudler.** 2004. Effects of long-term nitrogen fertilization on the uptake kinetics of atmospheric methane in temperate forest soils. *FEMS Microbiol. Ecol.* **49**:389-400.
- 81. **Gulledge, J., and J. P. Schimel.** 1998. Low-concentration kinetics of atmospheric CH₄ oxidation in soil and mechanism of NH₄⁺ inhibition. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:4291-4298.
- 82. **Hakemian, A. S., and A. C. Rosenzweig.** 2007. The biochemistry of methane oxidation. *Annu. Rev. Biochem.* **76**:223-241.
- 83. **Hammer, A., H. Hammer, and K. Hammer.** 2002. *Physikalische Formeln und Tabellen*, 8th ed. J. Lindauer Verlag, München, Deutschland.
- 84. **Hammer, K. A., C. F. Carson, and T. V. Riley.** 2003. Antifungal activity of the components of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil. *J. Appl. Microbiol.* **95**:853-860.
- 85. **Hanson, R. S., and T. E. Hanson.** 1996. Methanotrophic bacteria. *Microbiol. Rev.* **60**:439-471.
- 86. **Harriss, R. C., and D. I. Sebacher.** 1982. Methane flux in the Great Dismal Swamp. *Nature* **297**:673-674.
- 87. **Heck, K. L. Jr., G. van Belle, and D. Simberloff.** 1975. Explicit calculation of the rarefaction diversity measurement and the determination of sufficient sample size. *Ecology* **56**:1459-1461.
- 88. **Henckel, T., U. Jäckel, S. Schnell, and R. Conrad.** 2000. Molecular analyses of novel methanotrophic communities in forest soil that oxidize atmospheric methane. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**:1801-1808.
- 89. **Henckel, T., P. Roslev, and R. Conrad.** 2000. Effects of O₂ and CH₄ on presence and activity of the indigenous methanotrophic community in rice field soil. *Environ. Microbiol.* **2**:666-679.

-
90. **Héry, M., A. C. Singer, D. Kumaresan, L. Bodrossy, N. Stralis Pavese, J. I. Prosser, I. P. Thompson, and J. C. Murrell.** 2008. Effect of earthworms on the community structure of active methanotrophic bacteria in a landfill cover soil. *ISME J.* **2**:92-104.
 91. **Heyer, J.** 1990. *Kreislauf des Methans. Mikrobiologie, Ökologie, Nutzung.* Akademie-Verlag, Berlin.
 92. **Heyer, J., V. F. Galchenko, and P. F. Dunfield.** 2002. Molecular phylogeny of type II methane-oxidizing bacteria isolated from various environments. *Microbiol.* **148**:2831-2846.
 93. **Holmes, A. J., A. Costello, M. E. Lidstrom, and J. C. Murrell.** 1995. Evidence that particulate methane monooxygenase and ammonia monooxygenase may be evolutionarily related. *FEMS Microbiol. Lett.* **132**:203-208.
 94. **Holmes, A. J., N. J. Owens, and J. C. Murrell.** 1995. Detection of novel marine methanotrophs using phylogenetic and functional gene probes after methane enrichment. *Microbiol.-UK* **141**:1947-1955.
 95. **Holmes, A. J., P. Roslev, I. R. McDonald, N. Iversen, K. Henriksen, and J. C. Murrell.** 1999. Characterization of methanotrophic bacterial populations in soils showing atmospheric methane uptake. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:3312-3318.
 96. **Holubová, V., P. Hrdlička, and V. Kubáň.** 2001. Age and space distributions of monoterpenes in fresh needles of *Picea abies* (L) karst. determined by gas chromatography-mass spectrometry. *Phytochem. Analysis* **12**:243-249.
 97. **Holzapfel-Pschorn, A., W. Seiler, and R. Conrad.** 1985. Production, oxidation and emission of methane in rice paddies. *FEMS Microbiol. Ecol.* **31**:343-351.
 98. **Horz, H. P., V. Rich, S. Avrahami, and B. J. Bohannon.** 2005. Methane-oxidizing bacteria in a California upland grassland soil: diversity and response to simulated global change. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**:2642-2652.

99. **Hou, S., K. S. Makarova, J. H. W. Saw, P. Senin, B. V. Ly, Z. Zhou, Y. Ren, J. Wang, M. Y. Galperin, M. V. Omelchenko, Y. I. Wolf, N. Yutin, E. V. Koonin, M. B. Stott, B. W. Mountain, M. A. Crowe, A. V. Smirnova, P. F. Dunfield, L. Feng, L. Wang, and M. Alam.** 2008. Complete genome sequence of the extremely acidophilic methanotroph isolate V4, *Methylacidiphilum infernorum*, a representative of the bacterial phylum *Verrucomicrobia*. *Biol. Direct* **3**:doi:10.1186/1745-6150-3-26.
100. **Hurlbert, S. H.** 1971. The nonconcept of species diversity: a critique and alternative parameters. *Ecology* **52**:577-586.
101. **Hutchens, E., S. Radajewski, M. G. Dumont, I. R. McDonald, and J. C. Murrell.** 2004. Analysis of methanotrophic bacteria in Movile Cave by stable isotope probing. *Environ. Microbiol.* **6**:111-120.
102. **Islam, T., S. Jensen, L. J. Reigstad, O. Larsen, and N. K. Birkeland.** 2008. Methane oxidation at 55°C and pH 2 by a thermoacidophilic bacterium belonging to the *Verrucomicrobia* phylum. *PNAS* **105**:300-304.
103. **Jaatinen, K., C. Knief, P. F. Dunfield, K. Yrjälä, and H. Fritze.** 2004. Methanotrophic bacteria in boreal forest soil after fire. *FEMS Microbiol. Ecol.* **50**:195-202.
104. **Jäckel, U., S. Schnell, and R. Conrad.** 2004. Microbial ethylene production and inhibition of methanotrophic activity in a deciduous forest soil. *Soil Biol. Biochem.* **36**:835-840.
105. **Jang, I., S. Lee, J. Hong, and H. Kang.** 2006. Methane oxidation rates in forest soils and their controlling variables: a review and a case study in Korea. *Ecol. Res.* **21**:849-854.
106. **Jensen, S., A. J. Holmes, R. A. Olsen, and J. C. Murrell.** 2000. Detection of methane oxidizing bacteria in forest soil by monooxygenase PCR amplification. *Microb. Ecol.* **39**:282-289.
107. **Jones, D. L.** 1998. Organic acids in the rhizosphere - a critical review. *Plant Soil* **205**:25-44.
108. **Jones, D. T., W. R. Taylor, and J. M. Thornton.** 1992. The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. *Comput. Appl. Biosci.* **8**:275-282.

-
109. **Jones, R. D., and R. Y. Morita.** 1983. Methane oxidation by *Nitrosococcus oceanus* and *Nitrosomonas europaea*. Appl. Environ. Microbiol. **45**:401-410.
110. **Kähkönen, M. A., C. Wittmann, H. Ilvesniemi, C. J. Westman, and M. S. Salkinoja-Salonen.** 2002. Mineralization of detritus and oxidation of methane in acid boreal coniferous forest soils: seasonal and vertical distribution and effects of clear-cut. Soil Biol. Biochem. **34**:1191-1200.
111. **Kaserer, H.** 1905. Über die Oxidation des Wasserstoffes und des Methan durch Mikroorganismen. (The oxidation of hydrogen and methane by microorganisms). Z. landw. Versuchsw. in Österreich **8**:789-792.
112. **Keppler, F., J. T. G. Hamilton, M. Braß, and T. Röckmann.** 2006. Methane emissions from terrestrial plants under aerobic conditions. Nature **439**:187-191.
113. **Khmelenina, V. N., M. G. Kalyuzhnaya, N. G. Starostina, N. E. Suzina, and Y. A. Trotsenko.** 1997. Isolation and characterization of halotolerant alkaliphilic methanotrophic bacteria from Tuva soda lakes. Curr. Microbiol. **35**:257-261.
114. **Kibbe, W. A.** 2007. OligoCalc: an online oligonucleotide properties calculator. Nucleic Acids Res. **35**:W43-W46. http://nar.oxfordjournals.org/cgi/screenpdf/35/suppl_2/W43.pdf.
115. **King, G. M., and K. Nanba.** 2008. Distribution of atmospheric methane oxidation and methanotrophic communities in Hawaiian volcanic deposits and soils. Microbes Environ. **23**:326-330.
116. **Klappenbach, J. A., P. R. Saxman, J. R. Cole, and T. M. Schmidt.** 2001. rrndb: the ribosomal RNA operon copy number database. Nucleic Acids Res. **29**:181-184.
117. **Knief, C., and P. F. Dunfield.** 2005. Response and adaptation of different methanotrophic bacteria to low methane mixing ratios. Environ. Microbiol. **7**:1307-1317.
118. **Knief, C., S. Kolb, P. L. Bodelier, A. Lipski, and P. F. Dunfield.** 2006. The active methanotrophic community in hydromorphic soils changes in response to changing methane concentration. Environ. Microbiol. **8**:321-333.
119. **Knief, C., A. Lipski, and P. F. Dunfield.** 2003. Diversity and activity of methanotrophic bacteria in different upland soils. Appl. Environ. Microbiol. **69**:6703-6714.

120. **Knief, C., S. Vanitchung, N. W. Harvey, R. Conrad, P. F. Dunfield, and A. Chidthaisong.** 2005. Diversity of methanotrophic bacteria in tropical upland soils under different land uses. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**:3826-3831.
121. **Knittel, K., and A. Boetius.** 2009. Anaerobic oxidation of methane: progress with an unknown process. *Annu. Rev. Microbiol.* **63**:311-334.
122. **Kolb, S.** 2009. The quest for atmospheric methane oxidizers in forest soils. *Environ. Microbiol. Rep.* **1**:336-346.
123. **Kolb, S., C. Knief, P. F. Dunfield, and R. Conrad.** 2005. Abundance and activity of uncultured methanotrophic bacteria involved in the consumption of atmospheric methane in two forest soils. *Environ. Microbiol.* **7**:1150-1161.
124. **Kolb, S., C. Knief, S. Stubner, and R. Conrad.** 2003. Quantitative detection of methanotrophs in soil by novel *pmoA*-targeted real-time PCR assays. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**:2423-2429.
125. **Könneke, M., A. E. Bernhard, J. R. de la Torre, C. B. Walker, J. B. Waterbury, and D. A. Stahl.** 2005. Isolation of an autotrophic ammonia-oxidizing marine archaeon. *Nature* **437**:543-546.
126. **Koops, H. P., and A. Pommerening-Roser.** 2001. Distribution and ecophysiology of the nitrifying bacteria emphasizing cultured species. *FEMS Microbiol. Ecol.* **37**:1-9.
127. **Kretzschmar, R.** 1996. Kulturtechnisch-bodenkundliches Praktikum, ausgewählte Labor- und Feldmethoden, 1st ed. Universität Kiel, Kiel, Deutschland.
128. **Küsel, K., and H. L. Drake.** 1995. Effects of environmental parameters on the formation and turnover of acetate by forest soils. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**:3667-3675.
129. **Lane, D. J.** 1991. 16S/23S rRNA sequencing. p. 115-175. *In* E. Stackebrandt, and M. Goodfellow. *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. John Wiley and Sons Ltd., Chichester.
130. **Lau, E., A. Ahmad, P. A. Steudler, and C. M. Cavanaugh.** 2007. Molecular characterization of methanotrophic communities in forest soils that consume atmospheric methane. *FEMS Microbiol. Ecol.* **60**:490-500.

-
131. **Le Treut, H., R. Sommerville, U. Cubasch, Y. Ding, C. Mauritzen, A. Mokssit, T. Peterson, and M. Prather.** 2007. Historical overview of climate change. *In* S. Solomon, D. Quin, M. Manning, Z. Chen, M. Marquis, K. B. Averyt, M. Tignor, and H. L. Miller. Climate Change 2007, The physical science basis. Contribution of working group I to the fourth assessment report of the intergovernmental panel on climate change. Cambridge University Press, Cambridge, UK and NY, USA.
132. **Lieberman, R. L., and A. C. Rosenzweig.** 2004. Biological methane oxidation: Regulation, biochemistry, and active site structure of particulate methane monooxygenase. *Crit. Rev. Biochem. Mol.* **39**:147-164.
133. **Lottspeich, F.** 2006. Bioanalytik, 2nd ed. Spektrum Akademischer Verlag, München.
134. **Ludley, K. E., S. M. Jickells, P. M. Chamberlain, J. Whitaker, and C. H. Robinson.** 2009. Distribution of monoterpenes between organic resources in upper soil horizons under monocultures of *Picea abies*, *Picea sitchensis* and *Pinus sylvestris*. *Soil Biol. Biochem.* **41**:1050-1059.
135. **Ludley, K. E., C. H. Robinson, S. Jickells, P. M. Chamberlain, and J. Whitaker.** 2008. Differential response of ectomycorrhizal and saprotrophic fungal mycelium from coniferous forest soils to selected monoterpenes. *Soil Biol. Biochem.* **40**:669-678.
136. **Ludley, K. E., C. H. Robinson, S. Jickells, P. M. Chamberlain, and J. Whitaker.** 2009. Potential for monoterpenes to affect ectomycorrhizal and saprotrophic fungal activity in coniferous forests is revealed by novel experimental system. *Soil Biol. Biochem.* **41**:117-124.
137. **Ludwig, W., O. Strunk, R. Westram, L. Richter, H. Meier, Yadhukumar, A. Buchner, T. Lai, S. Steppi, G. Jobb, W. Förster, I. Brettske, S. Gerber, A. W. Ginhart, O. Gross, S. Grumann, S. Hermann, R. Jost, A. König, T. Liss, R. Lüßmann, M. May, B. Nonhoff, B. Reichel, R. Strehlow, A. Stamatakis, N. Stuckmann, A. Vilbig, M. Lenke, T. Ludwig, A. Bode, and K. H. Schleifer.** 2004. ARB: a software environment for sequence data. *Nucleic Acids Res.* **32**:1363-1371.
138. **Magurran, A. E.** 1988. Ecological diversity and its measurement. Princeton University Press, Princeton, N.J.

139. **Mann, H. B., and D. R. Whitney.** 1947. On a test whether one of two random variables is stochastically larger than the other. *Ann. Math. Stat.* **18**:50-60.
140. **Matthies, C., A. Freiburger, and H. L. Drake.** 1993. Fumarate dissimilation and differential reductant flow by *Clostridium formicoaceticum* and *Clostridium aceticum*. *Arch. Microbiol.* **160**:273-278.
141. **Maurer, D., S. Kolb, L. Haumeier, and W. Borken.** 2008. Inhibition of atmospheric methane oxidation by monoterpenes in Norway spruce and European beech soils. *Soil Biol. Biochem.* **40**:3014-3020.
142. **Maxfield, P. J., E. R. Hornibrook, and R. P. Evershed.** 2006. Estimating high-affinity methanotrophic bacterial biomass, growth, and turnover in soil by phospholipid fatty acid C-13 labeling. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**:3901-3907.
143. **Maxfield, P. J., E. R. Hornibrook, and R. P. Evershed.** 2008. Acute impact of agriculture on high-affinity methanotrophic bacterial populations. *Environ. Microbiol.* **10**:1917-1924.
144. **McDonald, I. R., L. Bodrossy, Y. Chen, and J. C. Murrell.** 2008. Molecular ecology techniques for the study of aerobic methanotrophs. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**:1305-1315.
145. **Melin, E., and S. Krupa.** 1971. Studies on ectomycorrhizae of pine. II. Growth inhibition of mycorrhizal fungi by volatile organic constituents of *Pinus sylvestris* (Scots pine) roots. *Physiol. Plantarum* **25**:337-340.
146. **Menyailo, O. V., W. R. Abraham, and R. Conrad.** 2010. Tree species affect atmospheric CH₄ oxidation without altering community composition of soil methanotrophs. *Soil Biol. Biochem.* **42**:101-107.
147. **Menyailo, O. V., and B. A. Hungate.** 2003. Interactive effects of tree species and soil moisture on methane consumption. *Soil Biol. Biochem.* **35**:625-628.
148. **Messing, J.** 1983. New M13 vectors for cloning. *Methods in Enzymology* **101**:20-78.
149. **Mohanty, S. R., P. L. E. Bodelier, and R. Conrad.** 2007. Effect of temperature on composition of the methanotrophic community in rice field and forest soil. *FEMS Microbiol. Ecol.* **62**:24-31.

-
150. **Mohanty, S. R., P. L. E. Bodelier, V. Floris, and R. Conrad.** 2006. Differential effects of nitrogenous fertilizers on methane-consuming microbes in rice field and forest soils. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**:1346-1354.
151. **Mosier, A., D. Schimel, D. Valentine, K. Bronson, and W. Parton.** 1991. Methane and nitrous oxide fluxes in native, fertilized and cultivated grasslands. *Nature* **350**:330-332.
152. **Müller, J., H. Bußler, and T. Kneib.** 2008. Saprophytic beetle assemblages related to silvicultural management intensity and stand structures in a beech forest in Southern Germany. *J. Insect Conserv.* **12**:107-124.
153. **Muys, B., and P. Granval.** 1997. Earthworms as bio-indicators of forest site quality. *Soil Biol. Biochem.* **29**:323-328.
154. **Muyzer, G., E. C. Dewaal, and A. G. Uitterlinden.** 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel-electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S ribosomal RNA. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**:695-700.
155. **Nicol, G. W., and C. Schleper.** 2006. Ammonia-oxidising *Crenarchaeota*: important players in the nitrogen cycle? *Trends Microbiol.* **14**:207-212.
156. **Nielsen, A. K., K. Gerdes, H. Degn, and J. C. Murrell.** 1996. Regulation of bacterial methane oxidation: transcription of the soluble methane monooxygenase operon of *Methylococcus capsulatus* (Bath) is repressed by copper ions. *Microbiol.* **142**:1289-1296.
157. **Nielsen, A. K., K. Gerdes, and J. C. Murrell.** 1997. Copper-dependent reciprocal transcription regulation of methane monooxygenase genes in *Methylococcus capsulatus* and *Methylosinus trichosporium*. *Mol. Microbiol.* **25**:399-409.
158. **Niemann, H., T. Lösekann, D. de Beer, M. Elvert, T. Nadalig, K. Knittel, R. Amann, E. J. Sauter, M. Schlüter, M. Klages, J. P. Foucher, and A. Boetius.** 2006. Novel microbial communities of the Haakon Mosby mud volcano and their role as methane sink. *Nature* **443**:854-858.
159. **Omelchenko, M. V., L. V. Vasilyeva, and G. A. Zavarzin.** 1993. Psychrophilic methanotroph from tundra soil. *Curr. Microbiol.* **27**:255-259.

160. **Op den Camp, H. J. M., T. Islam, M. B. Stott, H. R. Harhangi, A. Hynes, S. Schouten, M. S. M. Jetten, N. K. Birkeland, A. Pol, and P. F. Dunfield.** 2009. Environmental, genomic and taxonomic perspectives on methanotrophic *Verrucomicrobia*. *Environ. Microbiol. Rep.* **1**:293-306.
161. **Pacheco-Oliver, M., I. R. McDonald, D. Groleau, J. C. Murrell, and C. B. Miguez.** 2002. Detection of methanotrophs with highly divergent *pmoA* genes from Arctic soils. *FEMS Microbiol. Lett.* **209**:313-319.
162. **Petit, J. R., J. Jouzel, D. Raynaud, N. I. Barkov, J. M. Barnola, I. Basile, M. Bender, J. Chappellaz, M. Davis, G. Delaygue, M. Delmotte, V. M. Kotlyakov, M. Legrand, V. Y. Lipenkov, C. Lorius, L. Pépin, C. Ritz, E. Saltzman, and M. Stievenard.** 1999. Climate and atmospheric history of the past 420,000 years from the Vostok ice core, Antarctica. *Nature* **399**:429-436.
163. **Plachter, H.** 1991. *Naturschutz*, 1st ed. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, Jena.
164. **Pol, A., K. Heijmans, H. R. Harhangi, D. Tedesco, M. S. M. Jetten, and H. J. M. Op den Camp.** 2007. Methanotrophy below pH 1 by a new *Verrucomicrobia* species. *Nature* **450**:874-878.
165. **Precht, M., R. Kraft, and M. Bachmaier.** 2005. *Angewandte Statistik 1*, 7th ed. Oldenbourg Verlag, München, Deutschland.
166. **Priemé, A., S. Christensen, K. E. Dobbie, and K. A. Smith.** 1997. Slow increase in rate of methane oxidation in soils with time following land use change from arable agriculture to woodland. *Soil Biol. Biochem.* **29**:1269-1273.
167. **Raeymaekers, L.** 2000. Basic principles of quantitative PCR. *Mol. Biotechnol.* **15**:115-122.
168. **Raghoebarsing, A. A., A. Pol, K. T. van de Pas-Schoonen, A. J. Smolders, K. F. Ettwig, W. I. Rijpstra, S. Schouten, J. S. Damsté, H. J. Op den Camp, M. S. Jetten, and M. Strous.** 2006. A microbial consortium couples anaerobic methane oxidation to denitrification. *Nature* **440**:918-921.
169. **Reay, D. S., D. B. Nedwell, N. McNamara, and P. Ineson.** 2005. Effect of tree species on methane and ammonium oxidation capacity in forest soils. *Soil Biol. Biochem.* **37**:719-730.

-
170. **Ricke, P., C. Erkel, M. Kube, R. Reinhardt, and W. Liesack.** 2004. Comparative analysis of the conventional and novel *pmo* (Particulate methane monooxygenase) operons from *Methylocystis* strain SC2. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**:3055-3063.
171. **Ricke, P., M. Kube, S. Nakagawa, C. Erkel, R. Reinhardt, and W. Liesack.** 2005. First genome data from uncultured upland soil cluster alpha methanotrophs provide further evidence for a close phylogenetic relationship to *Methylocapsa acidiphila* B2 and for high-affinity methanotrophy involving particulate methane monooxygenase. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**:7472-7482.
172. **Roslev, P., N. Iversen, and K. Henriksen.** 1997. Oxidation and assimilation of atmospheric methane by soil methane oxidizers. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:874-880.
173. **Rothe, A., C. Huber, K. Kreutzer, and W. Weis.** 2002. Deposition and soil leaching in stands of Norway spruce and European Beech: results from the Högwald research in comparison with other European case studies. *Plant Soil* **240**:33-45.
174. **Saari, A., J. Heiskanen, and P. J. Martikainen.** 1998. Effect of the organic horizon on methane oxidation and uptake in soil of a boreal Scots pine forest. *FEMS Microbiol. Ecol.* **26**:245-255.
175. **Saari, A., P. J. Martikainen, A. Ferm, J. Ruuskanen, W. de Boer, Troelstra, SR, and H. J. Laanbroek.** 1997. Methane oxidation in soil profiles of Dutch and Finnish coniferous forests with different soil texture and atmospheric nitrogen deposition. *Soil Biol. Biochem.* **29**:1625-1632.
176. **Saari, A., R. Rinnan, and P. J. Martikainen.** 2004. Methane oxidation in boreal forest soils: Kinetics and sensitivity to pH and ammonium. *Soil Biol. Biochem.* **36**:1037-1046.
177. **Saiki, R. K., D. H. Gelfand, S. Stoffel, S. J. Scharf, R. Higuchi, G. T. Horn, K. B. Mullis, and H. A. Erlich.** 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**:487-491.
178. **Sambrook, J., and D. W. Russel.** 2001. *Molecular cloning. A laboratory manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, NY.
179. **Schloss, P. D.** 2008. Evaluating different approaches that test whether microbial communities have the same structure. *ISME J.* **2**:265-275.

- 180. **Schloss, P. D., and J. Handelsman.** 2005. Introducing DOTUR, a computer program for defining operational taxonomic units and estimating species richness. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**:1501-1506.
- 181. **Schloss, P. D., B. R. Larget, and J. Handelsman.** 2004. Integration of microbial ecology and statistics: a test to compare gene libraries. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**:5485-5492.
- 182. **Schmidt-Vogt, H.** 1977. *Die Fichte. Ein Handbuch in zwei Bänden, vol. 1.* Verlag Paul Parey, Hamburg, Berlin.
- 183. **Schnell, S., and G. M. King.** 1994. Mechanistic analysis of ammonium inhibition of atmospheric methane consumption in forest soils. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**:3514-3521.
- 184. **Schnell, S., and G. M. King.** 1996. Responses of methanotrophic activity in soils and cultures to water stress. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:3203-3209.
- 185. **Sexstone, A. J., and C. N. Mains.** 1990. Production of methane and ethylene in organic horizons of spruce forest soils. *Soil Biol. Biochem.* **22**:135-139.
- 186. **Singh, B. K., and K. Tate.** 2007. Biochemical and molecular characterization of methanotrophs in soil from a pristine New Zealand beech forest. *FEMS Microbiol. Lett.* **275**:89-97.
- 187. **Singh, B. K., K. R. Tate, G. Kolipaka, C. B. Hedley, C. A. Macdonald, P. Millard, and J. C. Murrell.** 2007. Effect of afforestation and reforestation of pastures on the activity and population dynamics of methanotrophic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**:5153-5161.
- 188. **Singleton, D. R., M. A. Furlong, S. L. Rathbun, and W. B. Whitman.** 2001. Quantitative comparisons of 16S rRNA gene sequence libraries from environmental samples. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**:4374-4376.
- 189. **Sjögersten, S., E. Melander, and P. A. Wookey.** 2007. Depth distribution of net methanotrophic activity at a mountain birch forest-tundra heath ecotone, northern Sweden. *Arc. Antarct. Alp. Res.* **39**:477-480.

-
190. **Smith, K. A., K. E. Dobbie, B. C. Ball, L. R. Bakken, B. K. Sitaula, S. Hansen, R. Brumme, W. Borken, S. Christensen, A. Prieme, D. Fowler, J. A. Macdonald, U. Skiba, L. Klemedtsson, A. Kasimir-Klemedtsson, A. Degorska, and P. Orlanski.** 2000. Oxidation of atmospheric methane in Northern European soils, comparison with other ecosystems, and uncertainties in the global terrestrial sink. *Glob. Change Biol.* **6**:791-803.
191. **SN EN ISO 11732.** 2005. Wasserbeschaffenheit - Bestimmung von Ammoniumstickstoff - Verfahren mittels Fließanalytik (CFA und FIA) und spektrometrischer Detektion. Beuth Verlag, Berlin, Deutschland.
192. **Söhngen, N. L.** 1906. Über Bakterien, welche Methan als Kohlenstoffnahrung und Energiequelle gebrauchen. *Zbl. Bakt. Parasit.* **15**:513-517.
193. **Stackebrandt, E., and B. M. Goebel.** 1994. Taxonomic note: A place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **44**:846-849.
194. **Steudler, P. A., R. D. Bowden, J. M. Melillo, and J. D. Aber.** 1989. Influence of nitrogen fertilization on methane uptake in temperate forest soils. *Nature* **341**:314-316.
195. **Stoecker, K., B. Bendinger, B. Schoning, P. H. Nielsen, J. L. Nielsen, C. Baranyi, E. R. Toenshoff, H. Daims, and M. Wagner.** 2006. Cohn's *Crenothrix* is a filamentous methane oxidizer with an unusual methane monooxygenase. *PNAS* **103**:2363-2367.
196. **Stolyar, S., A. M. Costello, T. L. Peeples, and M. E. Lidstrom.** 1999. Role of multiple gene copies in particulate methane monooxygenase activity in the methane-oxidizing bacterium *Methylococcus capsulatus* Bath. *Microbiol.-SGM* **145**:1235-1244.
197. **Stralis-Pavese, N., A. Sessitsch, A. Weilharter, T. Reichenauer, J. Riesing, J. Csontos, J. C. Murrell, and L. Bodrossy.** 2004. Optimization of diagnostic microarray for application in analysing landfill methanotroph communities under different plant covers. *Environ. Microbiol.* **6**:347-363.
198. **Sührig, A.** 2004. Kurzflügelkäfer (*Coleoptera: Staphylinidae*) und Weberknechte (*Arachnida: Opiliones*) in Mischbeständen aus Fichte und Buche im Vergleich zu Fichten- und Buchenreinbeständen - eine Studie im Solling, 1st ed. Cuvillier Verlag, Göttingen.

199. **Tamura, K., J. Dudley, M. Nei, and S. Kumar.** 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* **24**:1596-1599.
200. **Tate, K. R., D. J. Ross, S. Saggar, C. B. Hedley, J. Dando, B. K. Singh, and S. M. Lambie.** 2007. Methane uptake in soils from *Pinus radiata* plantations, a reverting shrubland and adjacent pastures: Effects of land-use change, and soil texture, water and mineral nitrogen. *Soil Biol. Biochem.* **39**:1437-1449.
201. **Taylor, S.** 1977. Evidence for presence of ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase and phosphoribonuclease in *Methylococcus capsulatus* (Bath). *FEMS Microbiol. Lett.* **2**:305-307.
202. **Tijhuis, L., M. C. M. Vanlossdrecht, and J. J. Heijnen.** 1993. A thermodynamically based correlation for maintenance gibbs energy requirements in aerobic and anaerobic chemotrophic growth. *Biotechnol. Bioeng.* **42**:509-519.
203. **Tlustos, P., T. W. Willison, J. C. Baker, D. V. Murphy, D. Pavlikova, K. W. Goulding, and D. S. Powlson.** 1998. Short-term effects of nitrogen on methane oxidation in soils. *Biol. Fertil. Soils* **28**:64-70.
204. **Torre, J. R. de la, C. B. Walker, A. E. Ingalls, M. Könneke, and D. A. Stahl.** 2008. Cultivation of a thermophilic ammonia oxidizing archaeon synthesizing crenarchaeol. *Environ. Microbiol.* **10**:810-818.
205. **Trenberth, K. E., P. D. Jones, P. Ambenje, R. Bojariu, D. Easterling, A. Klein Tank, D. Parker, F. Rahimzadeh, J. A. Renwick, M. Rusticucci, B. Soden, and P. Zhai.** 2007. Observations: Surface and atmospheric climate change. *In* S. Solomon, D. Quin, M. Manning, Z. Chen, M. Marquis, K. B. Averyt, M. Tignor, and H. L. Miller. *Climate Change 2007, The physical science basis. Contribution of working group I to the fourth assessment report of the intergovernmental panel on climate change.* Cambridge University Press, Cambridge, UK and NY, USA.
206. **Trombetta, D., F. Castelli, M. G. Sarpietro, V. Venuti, M. Cristani, C. Daniele, A. Saija, G. Mazzanti, and G. Bisignano.** 2005. Mechanisms of antibacterial action of three monoterpenes. *Antimicrob. Agents Ch.* **49**:2474-2478.

-
207. **Trotsenko, Y. A., and J. C. Murrell.** 2008. Metabolic aspects of aerobic obligate methanotrophy. p. 183-229. *In* I. Laskin Allen. Advances in applied microbiology, vol. 63. Academic press, London, UK.
208. **Valentine, D. L.** 2002. Biogeochemistry and microbial ecology of methane oxidation in anoxic environments: a review. *Antonie van Leeuwenhoek* **81**:272-282.
209. **Vigliotta, G. E., E. Nutricati, E. Carata, S. M. Tredici, M. de Stefano, P. Pontieri, D. R. Massardo, M. V. Prati, L. de Bellis, and P. Alitano.** 2007. *Clonothrix fusca* Roze 1896, a filamentous, sheated, methanotrophic gamma-proteobacterium. *Appl. Environm. Microbiol.* **73**:3556-3565.
210. **Vorholt, J. A.** 2002. Cofactor-dependent pathways of formaldehyde oxidation in methylotrophic bacteria. *Arch. Microbiol.* **178**:239-249.
211. **Vorholt, J. A., L. Chistoserdova, S. M. Stolyar, R. K. Thauer, and M. E. Lidstrom.** 1999. Distribution of tetrahydromethanopterin-dependent enzymes in methylotrophic bacteria and phylogeny of methenyl tetrahydromethanopterin cyclohydrolases. *J. Bacteriol.* **181**:5750-5757.
212. **Voysey, P. A., and P. M. Wood.** 1987. Methanol and formaldehyde oxidation by an autotrophic nitrifying bacterium. *Microbiol.* **133**:283-290.
213. **Ward, N., O. Larsen, J. Sakwa, L. Bruseth, H. Khouri, A. S. Durkin, G. Dimitrov, L. X. Jiang, D. Scanlan, K. H. Kang, M. Lewis, K. E. Nelson, B. Methe, M. Wu, J. F. Heidelberg, I. T. Paulsen, D. Fouts, J. Ravel, H. Tettelin, Q. H. Ren, T. Read, R. T. DeBoy, R. Seshadri, S. L. Salzberg, H. B. Jensen, N. K. Birkeland, W. C. Nelson, R. J. Dodson, S. H. Grindhaug, I. Holt, I. Eidhammer, I. Jonassen, S. Vanaken, T. Utterback, T. V. Feldblyum, C. M. Fraser, Lillehaug, JR, and J. A. Eisen.** 2004. Genomic insights into methanotrophy: The complete genome sequence of *Methylococcus capsulatus* (Bath). *Plos Biol.* **2**:1616-1628.
214. **White, C. S.** 1994. Monoterpenes - Their effects on ecosystem nutrient cycling. *J. Chem. Ecol.* **20**:1381—1406.
215. **Whittenbury, R., K. C. Phillips, and J. F. Wilkinson.** 1970. Enrichment, isolation, and some properties of methane-utilizing bacteria. *J. Gen. Microbiol.* **61**:205-218.

- 216. **Wilcoxon, F.** 1945. Individual comparisons by ranking methods. *Biometrics* **1**:80-83.
- 217. **Xu, X., and K. Inubushi.** 2007. Production and consumption of ethylene in temperate volcanic forest surface soils. *Eur. J. Soil Sci.* **58**:668-679.
- 218. **Yanisch-Perron, C., J. Vieira, and J. Messing.** 1985. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* **33**:103-119.
- 219. **Zaprasis, A., Y. J. Liu, S. J. Liu, H. L. Drake, and M. A. Horn.** 2010. Abundance of novel and diverse *tfdA*-like genes, encoding putative phenoxyalkanoic acid herbicide-degrading dioxygenases, in soil. *Appl. Environ. Microbiol.* **76**:119-128.
- 220. **Zechmeister-Boltenstern, S., and L. Nikodim.** 1999. Effect of water tension on ethylene production and consumption in montane and lowland soils in Austria. *Eur. J. Soil Sci.* **50**:425-432.

DANKSAGUNG

Mein Dank gilt allen, die direkt oder indirekt zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Dr. Steffen Kolb und PD Dr. Werner Borken für die Überlassung des Themas, die hervorragende Betreuung und die wertvollen Anregungen und gemeinsamen Diskussionen.

Prof. Harold L. Drake und Prof. Dr. Egbert Matzner danke ich für ihre stetige Unterstützung, die wertvollen Anregungen in den Seminaren und die Möglichkeit, meine Untersuchungen an ihren Lehrstühlen durchführen zu dürfen.

Ich danke außerdem allen jetzigen und ehemaligen ÖMIKs und BODs für ihre Unterstützung und das tolle Arbeitsklima, dabei speziell:

- Sonja Endres für die tolle Zusammenarbeit, die zahlreichen Diskussionen über die perfekte Bewerbung und Versicherung, ihre Chauffeurdienste, die guten Cappuccinos sowie die gelegentlichen süßen Überraschungen (Duplos, Hot Brownie mit Eis). Und ganz besonders danke ich ihr für die fleißige Job-Agentur Endres.
- Katharina Palmer, Peter Depkat-Jakob und Stefanie Schellenberger, die immer ein offenes Ohr für all meine Problemchen hatten. Danke für alle fachlichen und privaten Diskussionen, Ratschläge, Tipps und Tricks. Danke außerdem für die schöne Zeit in Schweden, Kathi.
- Danke an das Kaffee-Team! So eine Kaffeepause macht doch selbst den anstrengendsten Labortag erträglich.
- Adam Wieczorek, Ralf Mertel, Sindy Hunger und all meinen HIWIs für ihre Hilfe bei diversen Probennahmen und Experimenten.
- Jan Muhr, Janine Franke und Daniel Maurer für ihre Unterstützung bei der Planung, dem Aufbau und der Durchführung der Mikrokosmen-Anlage.

Heinz-Ulrich Krüger von der Forschungsstelle Atmosphärische Chemie möchte ich dafür danken, dass er mir sämtliche Utensilien für die Gasmischanlage aufgebaut und zur Verfügung gestellt hat.

Ulrich Mergner, Leiter des Forstamts Ebrach, danke ich für seine Zeit und Mühe, einen geeigneten Standort zur Probennahme im Steigerwald zu finden.

Den Mitgliedern von METHECO (The role of microbial diversity in the dynamics and stability of global methane consumption: microbial methane oxidation as a model-system for microbial ecology), ein Forschungsprojekt der European Science Foundation: Danke für die wertvollen Diskussionen und Anregungen, für den schönen Workshop in Nieuwersluis im Januar 2009 und für die Bereitstellung des DNA-Extraktionsprotokolls und der *pmoA*-Datenbank.

Meiner Familie danke ich, dass sie immer an mich geglaubt und mich unterstützt hat. Für meinen Opi bin ich schon seit Jahren die Frau Doktor.

Ein besonderer Dank geht natürlich an meinen Schatz Michael Rank, der es immer wieder schafft, mich auch zum Lachen zu bringen, wenn ich gerade besonders gestresst bin!

PUBLIKATIONEN

Artikel in Zeitschriften mit „Peer-Review“-System

Teile dieser Arbeit wurden in internationalen Zeitschriften veröffentlicht:

Degelmann, D.M., W. Borken, H.L. Drake, and S. Kolb. 2010. Different Atmospheric Methane-Oxidizing Communities in European Beech and Norway Spruce Soils. *Applied and Environmental Microbiology*. 76(10): 3228-3235.

Degelmann, D.M., S. Kolb, and W. Borken. 2009. Methane Oxidation Kinetics Differ in European Beech and Norway Spruce Soils. *European Journal of Soil Science* **60**:499-506.

Weitere Publikation:

Degelmann, D.M., S. Kolb, M.G. Dumont, J.C. Murrell, and H.L. Drake. 2009. *Enterobacteriaceae* Facilitate the Anaerobic Degradation of Glucose by a Forest Soil. *FEMS Microbiology Ecology* **68**:312-319.

Tagungsbeiträge

Vorträge

Vorträge über Ergebnisse dieser Arbeit:

Degelmann, D.M., D. Maurer, W. Borken, and S. Kolb. 2009. Methanotrophic Activity and Diversity Decrease in Response to Spruce-Derived Monoterpenes. Abstractband BayCEER Workshop 2009 (Bayreuther Zentrum für Ökologie und Umweltforschung). Abstract O 1.5.

Degelmann, D.M., D. Maurer, W. Borken, and S. Kolb. 2009. Activity and Diversity of Soil Methanotrophs are Reduced by the Impact of Norway Spruce. METHECO-Workshop in Nieuwersluis, Niederlande (METHECO, The role of microbial diversity in the dynamics and stability of global methane consumption: microbial methane oxidation as a model-system for microbial ecology; ein Forschungsprojekt der European Science Foundation).

Weiterer Vortrag:

Degelmann, D.M., H.L. Drake, and S. Kolb. 2007. *Enterobacteriaceae* Facilitate the Anaerobic Degradation of Glucose in Aerated Forest Soils. Abstractband der Jahrestagung der VAAM (Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie). BioSpectrum. Abstract KE 10.

Poster

Ergebnisse dieser Arbeit wurden als Poster auf nationalen und internationalen Tagungen vorgestellt

Degelmann, D.M., D. Maurer, W. Borken, and S. Kolb. 2009. Methanotrophic Activity and Diversity Decrease in Response to Spruce-Derived Monoterpenes. Abstractband Bageco-Tagung 2009 (10th International Symposium on Bacterial Genetics and Ecology). Abstract P 53.

Weitere Poster:

Degelmann, D.M., S. Kolb, M.G. Dumont, J.C. Murrell, and H.L. Drake. 2009. Facultative *Enterobacteriaceae* as Key Organisms during the Anaerobic Degradation of Glucose in a Spruce Soil. Abstractband Bageco-Tagung 2009 (10th International Symposium on Bacterial Genetics and Ecology). Abstract P 129.

Degelmann, D.M., S. Kolb, and H.L. Drake. 2007. Involvement of *Enterobacteriaceae* in Anaerobic Degradation of Glucose in Aerated Forest Soils. Abstractband International Symposium on Soil Processes under Extreme Meteorological Conditions. Abstract 66.

CURRICULUM VITAE

Daniela Marina Degelmann

Geburtsdatum: 04. Januar 1982
Geburtsort: Marktredwitz
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: ledig



Akademische und schulische Ausbildung

12/2006 - 11/2009 Promotionsstudium
Lehrstuhl Ökologische Mikrobiologie, Universität Bayreuth

10/2006 Studienabschluss als Diplom-Biologin

10/2001 - 10/2006 Studium der Diplom-Biologie
Universität Bayreuth

Kooperation 11/2005: Zehntägiger Aufenthalt am Department of Biological Sciences der University of Warwick, UK: Wissenschaftliche

2006: Diplomarbeit (9 Monate). Lehrstuhl Ökologische Mikrobiologie. „Beteiligung von Prokaryoten am anaeroben Abbau organischer Substanz in belüfteten Waldböden“

2005: Projektarbeit (3 Monate). Lehrstuhl Ökologische Mikrobiologie „Evolution des Acetatstoffwechsels: Schlüsselenzyme Acetatkinase und AMP-bildende Acetyl-Coenzy A Synthetase“

06/2001 Allgemeine Hochschulreife
Otto-Hahn-Gymnasium Marktredwitz

Sprachkenntnisse

Englisch: flüssig in Wort und Schrift
Französisch: Grundkenntnisse
Latein: Latinum (sieben Jahre)

ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbst verfasst und nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Weiterhin versichere ich, dass ich bei keiner anderen Universität ein Promotionsgesuch eingereicht oder eine Dissertation begonnen habe.

Bayreuth, 23. Dezember 2010